

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

ANALYSE DU RÔLE DE LA PIMT DANS L'INVASION DES CELLULES  
CANCÉREUSES DU CERVEAU

MÉMOIRE  
PRÉSENTÉ  
COMME ÉXIGENCE PARTIELLE  
DE LA MAÎTRISE EN BIOCHIMIE

PAR  
FATIMA BELKOURCHIA

MARS 2016

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL  
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.07-2011). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

## REMERCIEMENTS

J'aimerais tout d'abord remercier du fond du cœur mon directeur de Recherche Dr. Richard Desrosiers pour m'avoir donné la chance de travailler dans son laboratoire et m'avoir très bien supervisé. Sa confiance, sa grande disponibilité, ses bons conseils, sa compréhension, sa patience et son soutien financier ont permis de mener à bien ce projet de maîtrise. Il a su m'apporter une rigueur ainsi que les connaissances scientifiques et cela m'a donné envie de continuer au doctorat.

J'aimerais remercier le CRSNG pour leur soutien financier sur ce projet.

Je voulais également remercier Amira Ouanouki et Dr. Dahmane Ouazia pour leurs formations techniques, les réponses à mes questions et leur soutien moral.

Je remercie le laboratoire du Dr. Borhane Annabi pour l'accès à leurs équipements.

J'aimerais remercier toute ma famille, particulièrement mes parents, mes frères Reda, Monir, Majid, Hassan, ma petite sœur Nohila qui sont en France et mes grands-parents au Maroc qui ont toujours cru en moi et encouragé. Ma maman Nadia et mon papa Abdssamad ont toujours été à l'écoute sans limite, m'ont toujours soutenu et motivé dans mes choix, sachez que ma réussite est votre réussite, je vous aime énormément la famille.

Je remercie ma meilleure amie d'enfance Asmââ et toutes mes très bonnes amies, de belles rencontres, ma Popo d'amour et vous toutes mes chéries, de près ou de loin, de Montpellier à Montréal, merci pour votre soutien moral et tous les bons moments passés ensemble.

Je remercie tous ceux qui ont pu contribuer à ce projet dont le personnel de l'UQÀM.

Enfin, j'aimerais remercier le jury pour avoir accepté d'évaluer mon mémoire.

## DÉDICACE

À mes parents,  
Nadia et Abdssamad,  
Ma force,  
Qu'Allah vous préserve,  
Je vous aime.



## TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES .....	vii
LISTE DES TABLEAUX .....	ix
LISTE DES ABRÉVIATIONS .....	x
RÉSUMÉ .....	xii

### CHAPITRE I

INTRODUCTION .....	1
1.1 Les enzymes de réparation .....	1
1.1.1 Les méthyltransférases .....	1
1.2 La Protéine L-isoaspartyl méthyltransférase .....	2
1.2.1 Histoire de la PIMT .....	2
1.2.2 Caractéristiques de la PIMT .....	4
1.2.3 La PIMT est abondante dans le cerveau .....	6
1.2.4 La formation des résidus L-isoaspartates .....	9
1.2.5 Mécanisme de réparation de la PIMT .....	12
1.2.6 Réparation des protéines par la PIMT .....	13
1.2.7 La PIMT est nécessaire au bon fonctionnement du cerveau .....	14
1.2.8 Implication de la PIMT dans des voies de signalisation et réponse aux hormones .....	15
1.3 Cancer : généralité .....	16
1.3.1 Les tumeurs cérébrales .....	20
1.3.2 Les glioblastomes multiformes .....	22
1.4 L'implication de la PIMT dans le cancer .....	23
1.4.1 La PIMT dans la migration des cellules cancéreuses du sein .....	25

1.4.2	La PIMT régule la p53.....	27
1.4.3	L'implication de la PIMT avec la matrice extracellulaire .....	28
1.5	Les métalloprotéases.....	29
1.6	Objectifs de recherche .....	31

## CHAPITRE II

MATÉRIELS ET MÉTHODES .....	33
2.1 Matériels .....	33
2.2 Méthodes.....	34
2.2.1 Culture cellulaire .....	34
2.2.2 Transfection des cellules U-87 MG avec un ARN interférent dirigé contre la PIMT .....	34
2.2.3 Transfection des cellules U-87 MG avec des plasmides .....	34
2.2.4 Test de prolifération et viabilité cellulaire.....	35
2.2.5 Lyse cellulaire.....	35
2.2.6 Electrophorèse SDS-PAGE et buvardage de type Western.....	35
2.2.7 Immunodétection des protéines .....	36
2.2.8 Essai de migration : « Wound Healing » .....	37
2.2.9 Essai de migration : Chambres de Boyden .....	37
2.2.10 Invasion sur Matrigel.....	38
2.2.11 Zymographie.....	39
2.2.12 Analyses statistiques .....	39

## CHAPITRE III

RÉSULTATS.....	40
3.1 L'ARN interférent dirigé contre la PIMT inhibe son expression .....	40
3.2 La viabilité cellulaire n'est pas affectée par le niveau de PIMT par ARNi.....	40

3.3	La diminution de la PIMT par ARNi inhibe la migration des cellules U-87 MG .....	41
3.4	L'inhibition de la PIMT réduit la capacité des cellules cancéreuses U-87 MG à envahir le Matrigel .....	42
3.5	Des lignées stables des formes sauvage et mutée de la PIMT ont été établies dans les cellules U-87 MG .....	42
3.6	La viabilité cellulaire n'est pas affectée par la surexpression de la PIMT .....	43
3.7	La surexpression de la forme sauvage de la PIMT dans les lignées stables augmente la migration des cellules U-87 MG .....	43
3.8	La surexpression de la forme sauvage de la PIMT dans les lignées stables augmente l'invasion des cellules U-87 MG dans le Matrigel.....	44
3.9	L'inhibition et la surexpression de la PIMT n'affecte pas l'activation de pro-MMP-2 .....	45

#### CHAPITRE IV

DISCUSSION.....	67
4.1 L'implication de la PIMT dans la migration cellulaire.....	68
4.2 L'implication de la PIMT dans l'invasion.....	70
CONCLUSION .....	76
BIBLIOGRAPHIE.....	77

## LISTE DES FIGURES

Figure	Page
1.1	Structure de la PIMT humaine ..... 4
1.2	La structure cristalline de la PIMT humaine ..... 6
1.3	La PIMT a été détectée par buvardage de type Western dans le cytosol ou dans les membranes de plusieurs tissus de rats ..... 7
1.4	Les différents lobes de l'hémisphère gauche à partir d'une coupe sagittale du cerveau humain ..... 8
1.5	Profil d'expression protéique de la substance blanche ..... 9
1.6	La formation des résidus L-isoaspartates ..... 11
1.7	Les mécanismes de formations des résidus L-isoaspartates et réparation de ces dernières par la PIMT ..... 13
1.8	Tendances de l'incidence ainsi que de la mortalité des femmes et des hommes de tous âges atteints de tous types de cancers associés aux modifications du risque du cancer et des pratiques de lutte contre le cancer, mais aussi à la croissance démographique et du vieillissement de la population de 1986 à 2015 ..... 17
1.9	Les dix caractéristiques biologiques les plus connues d'une cellule cancéreuse ..... 19
1.10	Une coupe axiale du cerveau qui représente un glioblastome multiforme par résonance magnétique ..... 22
1.11	L'inhibition de la PIMT diminue la migration des cellules endothéliales humaines de veines ombilicales dépendantes du VEGF ..... 24
1.12	L'expression de la PIMT dans différentes lignées cancéreuses dont les cellules cancéreuses humaines rénales, astrocytomes humains et mélanomes, lorsqu'elles sont attachées ou détachées

	de la matrice extracellulaire.....	25
1.13	L'inhibition de la PIMT par ARN interférent diminue la migration des cellules cancéreuses du sein MDA-MB-231 .....	26
1.14	Schéma du processus EMT lors du détachement et réattachement des cellules cancéreuses MDA-MB-231 .....	27
1.15	Structure du domaine MMP et le repliement de pro-MMP-2 .....	30
3.1	Efficacité de l'inhibition de la PIMT par ARN interférent .....	48
3.2	L'inhibition de la PIMT par ARNi n'affecte pas la viabilité des cellules U-87 MG .....	49
3.3	L'inhibition de la PIMT par ARNi réduit la migration des cellules U-87 MG lors de l'essai du « Wound Healing » .....	51
3.4	L'inhibition de l'expression de la PIMT par ARNi réduit la migration des cellules U-87 MG lors de l'essai dans les chambres de Boyden .....	53
3.5	L'inhibition de l'expression de la PIMT par ARNi réduit l'invasion des cellules U-87 MG sur Matrigel .....	55
3.6	Niveau de surexpression des formes sauvage et mutée de la PIMT.....	57
3.7	La surexpression de la forme sauvage ou mutée de la PIMT n'affecte pas la viabilité des cellules U-87 MG.....	58
3.8	La surexpression de la PIMT sauvage augmente la migration des cellules U-87 MG dans l'essai du « Wound Healing » .....	60
3.9	La surexpression de la PIMT sauvage augmente la migration des cellules U-87 MG lors des essais dans les chambres de Boyden.....	62
3.10	La surexpression de la PIMT sauvage induit l'invasion des cellules U-87 MG dans le Matrigel.....	64
3.11	La PIMT n'affecte pas l'activation de la pro-MMP-2.....	66

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau	Page
1.1 Classification par l'OMS en 2007 des différents grades d'astrocytomes.....	20

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

AdoHcy	S-adénosyl-L-homocystéine
AdoMet	S-adénosyl-L-méthionine
AKT	Protéine kinase B (PKB)
APS	Persulfate d'ammonium
APP	<i>Amyloid precursor protein</i>
ARN	Acide ribonucléotidique
ARNi	ARN interférent
ARNm	ARN messenger
BSA	Albumine sérique bovine
ECL	<i>Enhanced chemiluminescence</i>
EMT	Transition épithéliale mésenchymateuse
ERK	<i>Extracellular-signal-regulated-kinase</i>
FBS	Serum bovin fœtal
FHP	Filaments hélicaux pairés
GBMs	Glioblastomes multiformes
GSK-3	<i>Glycogen kinase synthase-3</i>
HUVEC	Cellules endothéliales humaines de veines ombilicales
IGF	<i>Insulin like growth factor</i>
kDA	Kilodalton
MEC	Matrice extracellulaire
MEM	<i>Modified Eagle's medium</i>
MMPs	Métalloprotéinases
OMS	Organisation mondiale de la santé
p53	Protéine issue du gène <i>p53</i> suppresseur de tumeurs
PBS	Tampon phosphate salin

PDVF	Diflorure de polyvinylidène
PIMT	Protéine L-isoaspartate méthyltransférase
PNF	Plaques neurofibrillaires
PI3K	Phosphotidyl inositol triphosphate kinase
PKA	<i>Protein kinase A</i>
RMA	Lignée murine de lymphome
ROS	Réactifs de l'oxygène
SDS	Dodécyl sulfate de sodium
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
VEGF	Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire
siRNA	<i>Short interfering ribonucleic acid</i>
TBS	Tampon Tris salin
TEMED	N, N, N', N'-tétraméthyléthylènediamine
TGF	<i>Transforming growth factor</i>
Tris	Tris (hydroxylméthyl) aminométhane
U-87 MG	Cellules d'astrocytomes humains U87



## RÉSUMÉ

La protéine L-isoaspartyl (D-aspartyl) méthyltransférase (PIMT) est une enzyme qui répare les résidus L-isoaspartyl anormaux dans les protéines. Parmi tous les tissus examinés, la PIMT est la plus abondante dans le cerveau. D'autre part, son niveau d'expression augmente dans les cellules cancéreuses U-87 MG lorsqu'elles sont détachées de la matrice extracellulaire. Ces cellules sont aussi un modèle du principal type de tumeurs cérébrales, les glioblastomes. Récemment, il a été démontré que la PIMT avait des propriétés pro-angiogéniques. Ces deux caractéristiques de la PIMT nous emmènent à postuler que celle-ci peut jouer un rôle essentiel dans la croissance des glioblastomes. Pour investiguer le rôle de la PIMT dans l'acquisition des caractéristiques tumorales des glioblastomes, nous avons analysé son rôle dans la viabilité, la migration et l'invasion des cellules U-87 MG. La viabilité des cellules U-87 MG n'est ni affectée par une chute d'expression de la PIMT par ARN interférent (ARNi), ni par la surexpression de la forme sauvage (PIMT) ou mutée et inactive (PIMT D83V) de celle-ci. La diminution de la PIMT par ARNi inhibe significativement la migration cellulaire dans deux essais: la cicatrisation (« Wound Healing ») (44%) et les chambres de Boyden avec filtres recouverts de gélatine (40%). Nous avons établis des lignées stables de cellules U-87 MG surexprimant les formes sauvage et mutée de l'enzyme. La surexpression de la PIMT augmente significativement la migration cellulaire dans les deux essais : la cicatrisation (« Wound Healing ») (35%) et les chambres de Boyden avec filtres recouverts de gélatine (85%). Par contre, lors de la surexpression de la forme mutée et inactive de la PIMT, la migration cellulaire restait équivalente à celle observée au niveau basal. La même tendance a été observée dans la capacité des cellules U-87 MG à envahir le Matrigel. En effet, une inhibition significative de 40% a été observée lorsque le niveau de PIMT diminuait et une induction double lorsque la PIMT était surexprimée dans les cellules U-87 MG. Inversement, les cellules U-87 MG qui surexprimaient la PIMT mutée et inactive n'avaient aucun effet sur l'invasion. L'ensemble de ces résultats montre l'importance du niveau d'expression, et en particulier de l'activité catalytique de la PIMT, dans la migration des cellules cancéreuses U-87 MG.

*Mots clés : PIMT, glioblastomes, cellules U87, migration*

## CHAPITRE I

### INTRODUCTION

#### 1.1 Les enzymes de réparation

Les fonctions physiologiques sont dépendantes de la structure des protéines. Si la protéine est altérée, dans la majorité des cas, il y a une perte de fonction. D'où l'importance de cet équilibre physiologique. Plusieurs réactions non enzymatiques dont l'oxydation, la glycation, l'isomérisation et la désamidation peuvent altérer la structure ainsi que la fonction des protéines (Gomord et Faye, 2004). Généralement, lorsque les protéines sont altérées elles sont envoyées au protéasome pour y être dégradées. Si les protéines ne sont pas ubiquitinées elles peuvent être réparées par des enzymes. De plus, au cours du vieillissement les protéines endommagées s'accumulent car l'activité catalytique du protéasome diminue (Chondrogianni et Gonos, 2010). Il existe trois types d'enzymes réparatrices dans la cellule. Il y a les prolines isomérases qui réparent les cis-prolines en résidus trans prolines. Ensuite, celles qui réparent les méthionines oxydées et enfin la protéine L-isoaspartyl (D-aspartyl) méthyltransférase (PIMT) qui répare spécifiquement les résidus L-isoaspartates (Clarke, 2003; Desrosiers et Fanelus, 2011).

##### 1.1.1 Les méthyltransférases

Les modifications post-traductionnelles des protéines jouent un rôle essentiel dans les processus cellulaires dont la méthylation. Cette dernière est catalysée par les méthyltransférases qui dépendent de la S-adénosyl-L-méthionine (AdoMet) lui donnant des groupements méthyls. L'ADN, l'ARN ainsi que les protéines restent de très bons substrats pour ces enzymes. Il y a deux familles de protéines méthyltransférases, les protéines N-méthyltransférases et les protéines carboxylméthyltransférases.

Les N-méthyltransférases méthylent les groupes amines des résidus arginines retrouvés dans le cytosol et cela donne le  $\omega$ -N-méthylarginine. Le second type est localisé dans le nucléole et il est retrouvé dans différents types cellulaires et méthyle les groupes amines des résidus de lysines, cela résulte à des  $\epsilon$ -N-méthyllysines (Kim et Paik, 1970; Liss *et al.*, 1969).

Il y a quatre classes de carboxylméthyltransférases, l'enzyme de type I, classée EC 2.1.1.80, catalysant la réaction de méthylation des résidus L-glutamates des protéines chémoréceptrices des bactéries. L'enzyme de type II, classée EC 2.1.1.77, méthylant les protéines qui contiennent des résidus D-aspartyl et L-isoaspartyl, nommée PIMT (Aswad, 1984). Une troisième catégorie qui méthyle les groupes  $\alpha$ -carboxyles des cystéines isoprénylées en position C-terminal des protéines retrouvées chez les mammifères et les levures (Clarke, 1988). Enfin, une quatrième classe a été découverte par l'équipe de Clarke en 1994, où la protéine carboxylméthyltransférase modifie le groupement  $\alpha$ -carboxyle des résidus leucines C-terminales de protéines cytosoliques (Xie et Clarke, 1994).

## 1.2 La Protéine L-isoaspartyl méthyltransférase

### 1.2.1 Histoire de la PIMT

Tout a commencé en 1965, les chercheurs Axelrod et Daly ont été les premiers à découvrir l'enzyme. Lorsqu'ils ajoutaient du  $^3\text{(H)}$ -S-adenosyl-L-méthionine (AdoMet) radioactif dans des extraits hypophysaires, ils ont observé la formation de méthanol radioactif mais aucune activité catalytique de l'enzyme n'a été observée (Axelrod et Daly, 1965). En 1970, l'équipe de Kim et Paik ont purifié la protéine méthylase II, du thymus de veau, qui dépendait du  $^3\text{(H)}$ -S-adenosyl-L-méthionine et il y avait une synthèse de méthanol (Kim et Paik, 1970). En 1971, l'équipe de Graf a pris l'hormone, l'adrénocorticotrope, désamidée en position 25 formant un isopeptide (transpeptide isomérisé) par l'intermédiaire de l'hydrolyse du succinimide. De plus, la glycine qui suit (N+1), en position 26, lie ce résidu isomérisé au niveau du  $\beta$ -carboxyle de la chaîne latérale au lieu de la liaison normale en position  $\alpha$ -carboxyle (Graf *et al.*, 1971), une des

caractéristiques de la formation des résidus anormaux L-isoasparates. En 1973, Morin et Liss ont découvert, dans les glandes péituitaires, une enzyme qui formait du méthanol comme découverte par Axelrod et Daly et cette dernière méthylait des groupements carboxyles sur des protéines, tout en étant dépendante du S-adénosyl-L-méthionine (Morin et Liss, 1973). En 1974, les chercheurs Diliberto et Axelrod ont purifié une enzyme, de l'hypophyse bovine, qui méthylait les groupements carboxyles des protéines et des polypeptides. De plus, les hormones hypophysaires antérieures dont l'hormone folliculo stimulante, l'adrénocorticotrope, l'hormone de croissance, l'hormone stimulant la thyroïde et la prolactine étaient de bons substrats pour l'enzyme (Diliberto et Axelrod, 1974).

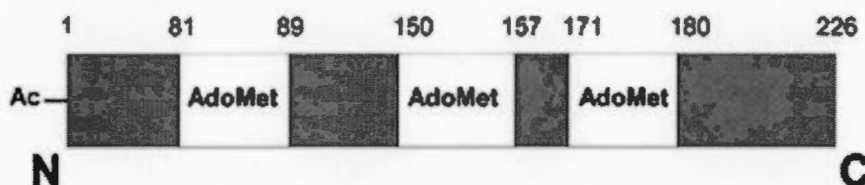
Par la suite, plusieurs chercheurs ont essayé d'identifier les différents rôles que pouvait avoir cette enzyme. Selon les chercheurs de l'équipe de Clarke mais aussi celle d'O'Dea, différents rôles physiologiques ont été identifiés pour la protéine carboxylméthyltransférase dont le relargage des vésicules, l'entreposage des hormones, la régulation de l'activité de la calmoduline, la chimiotaxie des leucocytes, la différenciation cellulaire et également la catalyse des modifications post-traductionnelles des protéines qui sont impliquées dans la division cellulaire (Barten et O'Dea, 1990; Clarke, 1985).

L'équipe d'Aswad a purifié la protéine carboxylméthyltransférase et l'a mis en présence de l'hormone, l'adrénocorticotrope (ACTH), native et désamidée. La forme désamidée de l'hormone, au niveau de l'asparagine 25, était le meilleur substrat pour l'enzyme puisque son pourcentage de méthylation était élevé (0,78 moles de CH<sub>3</sub>/mole de peptide) et les paramètres cinétiques de la désamidation de l'ACTH étaient très favorables (K<sub>m</sub> et V<sub>m</sub> étaient de 1,9 µM et 11,200 pmol/min/mg). En 1984, l'équipe d'Aswad a découvert que la liaison du groupement α-carboxyle libre d'un lien L-isoaspartyl était le meilleur site de méthylation pour l'enzyme (Aswad, 1984). En parallèle, Murray et Clarke ont montré que l'enzyme méthylait spécifiquement les résidus L-isoaspartates. C'était due à la désamidation de l'adrénocorticotrope qui par la réaction non enzymatique donné l'intermédiaire instable, le succinimide, qui produisait les résidus normaux d'un lien α-aspartyl et les résidus anormaux L-isoaspartyl d'un lien β-aspartyl (Murray et Clarke,

1984). L'enzyme méthylait également la forme D-aspartyl (Clarke, 1999) mais cela était très négligeable puisqu'elle avait une affinité 700 à 10 000 fois moins que son homologue le L-isoaspartyl (Lowenson et Clarke, 1992). Parmi les résidus aspartyls, les formes L-isoAsp et D-aspartyl étaient des substrats pour la PIMT contrairement à L-Asp et D-isoAsp mais la forme L-isoAsp était la mieux reconnue par la PIMT (Clarke, 2003). Cette année-là a permis de donner un nom à la protéine carboxylméthyltransférase, nouvellement nommée protéine L-isoaspartyl (D-aspartyl) méthyltransférase (PIMT).

### 1.2.2 Caractéristiques de la PIMT

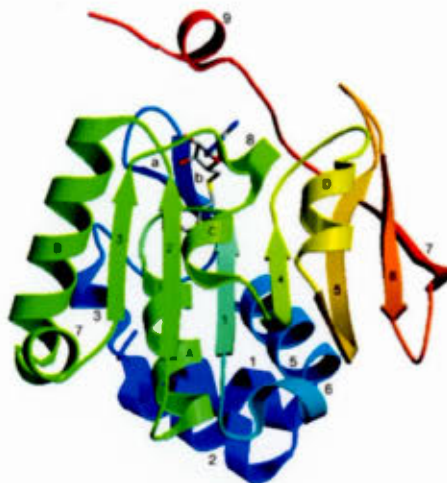
La PIMT est une enzyme ubiquitaire que l'on retrouve dans différents organismes dont les bactéries, les champignons, les plantes et les mammifères, de plus, elle est classée EC 2.1.1.77 (Clarke, 1999; David et Aswad, 1995; Ichikawa et Clarke, 1998; Kagan *et al.*, 1997). La PIMT est une enzyme de réparation monomérique de 226 acides aminés et de 24 500 daltons. On retrouve à son extrémité N-terminal une alanine qui est acétylée et trois régions qui lient l'AdoMet (Ingrosso *et al.*, 1989) (Figure 1.1).



**Figure 1.1** Structure de la PIMT humaine (Desrosiers et Fanelus, 2011).

La PIMT présente plusieurs variations alléliques sur son gène en position 22 et 119 (Ingrosso *et al.*, 1989). Une étude sur des érythrocytes humains (Norvégien et Corréen) a montré que la forme Ile-22 a une meilleure thermostabilité et celle de Val-119 a une meilleure affinité pour les protéines isomérisées (Clarke, 1999; David *et al.*, 1997).

La PIMT varie de 207 acides aminés pour *Escherichia Coli*, 227 pour la *Drosophila melanogaster* et 226 pour l'humain (Clarke, 1999). Chez l'humain, le gène de la PIMT est retrouvé au niveau du chromosome 6 en position 6q22.3-6q24, occupe 60 kb, compte 8 exons et 7 introns et chez la souris, il est retrouvé au niveau du chromosome 10 (DeVry *et al.*, 1996; MacLaren *et al.*, 1992b). Dans les tissus des mammifères, plusieurs formes proviennent d'un seul gène dû à l'épissage alternatif. Pour le gène de la PIMT, il existe deux isoformes principales, types I et II. La purification initiale de l'enzyme a été faite avec le cerveau de bœuf. Le poids moléculaire de ces deux isoformes était identique et elles diffèrent juste de leur point isoélectrique. L'isoforme I a un pI d'environ 6,5 et l'isoforme II était séparée en deux composés à un pI entre 5,6 et 5,7. Dans les érythrocytes de l'humain et de boeuf, la même situation était observée. Ainsi, deux isoformes, types I et II, ont été étudiées et les pI étaient de 6,6 pour le type I et 5,5 pour le type II (Gilbert *et al.*, 1988; Ota *et al.*, 1988). L'isoforme de type I a une séquence –RWK (arginine-tryptophane-lysine) en C-terminal, contrairement à l'isoforme II, avec une séquence –RDEL (arginine-aspartate-glutamate-leucine) (MacLaren *et al.*, 1992a). L'isoforme de type II avec une séquence –RDEL est semblable à un signal de rétention du réticulum endoplasmique –KDEL (Pelham, 1990) mais aucune étude précise n'a montré que la PIMT est présente dans le réticulum endoplasmique. Par la suite, deux autres isoformes ont été analysées chez l'humain avec un pI de 5,7 et 5,9 et elles étaient très exprimées dans les tissus cérébraux sains comparativement à ceux qui étaient épileptiques (Lanthier *et al.*, 2002).



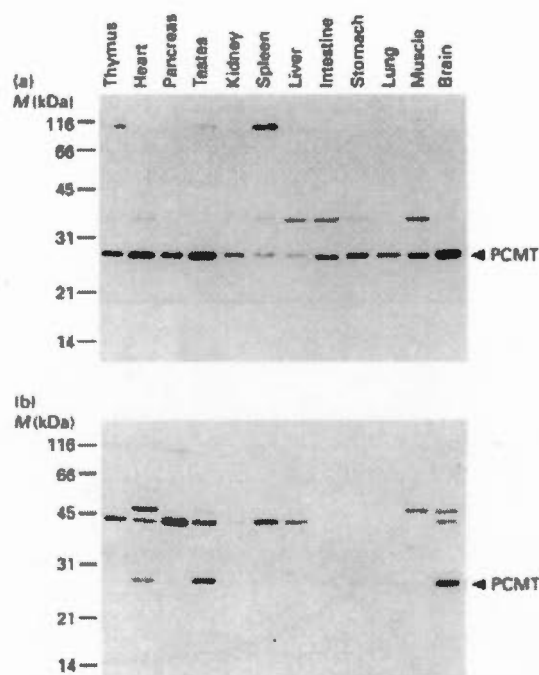
**Figure 1.2** La structure cristalline de la PIMT humaine (Ryttersgaard et al., 2002), légendée selon (Griffith *et al.*, 2001; Skinner *et al.*, 2000).

La structure cristalline de la PIMT humaine a été établie à une résolution de 2,1 Å (Figure 1.2). La PIMT a une structure secondaire en sandwich  $\alpha/\beta/\alpha$  doublement enroulée. Elle a une poche de liaison pour le co-facteur AdoMet. Lorsque la PIMT humaine était comparée à ses homologues d'autres espèces, trois acides aspartiques (Asp) étaient bien conservés, Asp 83, Asp 36 et Asp 109, lesquels étaient enfouis à l'intérieur de la protéine (Ryttersgaard *et al.*, 2002).

### 1.2.3 La PIMT est abondante dans le cerveau

Chez les mammifères, elle est exprimée dans tous les tissus et parmi ces tissus c'est au niveau du cerveau qu'elle est très abondante, suivi des testicules et du cœur que cela soit au niveau membranaire ou cytosolique (Boivin *et al.*, 1995; Diliberto et Axelrod, 1976) (Figure 1.3). Même s'il existe une forme membranaire, la PIMT reste majoritairement cytosolique (Desrosiers et Fanelus, 2011).

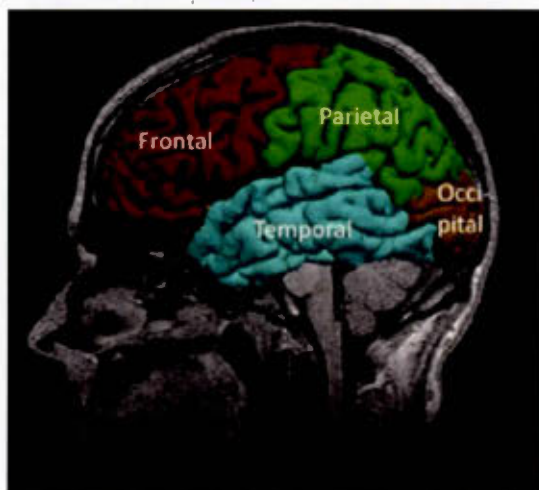




**Figure 1.3** La PIMT (PCMT) a été détectée par buvardage de type Western dans le cytosol (a) ou dans les membranes (b) de plusieurs tissus de rats (Boivin *et al.*, 1995).

L'activité de la PIMT était très élevée dans différentes régions du cerveau dont le cortex, l'hippocampe, l'hypothalamus, le striatum et les amygdales (Billingsley *et al.*, 1985; Diliberto et Axelrod, 1976; Mizobuchi *et al.*, 1994). L'abondance de la PIMT au niveau du cerveau a été confirmée par une analyse de type Northern Blot de son ARNm (Mizobuchi *et al.*, 1994). Ainsi, son expression et son activité catalytique était très abondante au niveau du cortex cérébral et l'hippocampe mais également au niveau des testicules (Mizobuchi *et al.*, 1994). La PIMT était très fortement exprimée au niveau des neurones (Billingsley *et al.*, 1985) mais faiblement dans les cellules gliales et les oligodendrocytes (Shirasawa *et al.*, 1995). Après une analyse protéomique du cerveau humain, la PIMT a été retrouvée dans le lobe frontal, pariétal, temporal et occipital des différents hémisphères (Pozzi Mucelli *et al.*, 2006) (Figure 1.4). Elle a également été retrouvée au niveau du cerveau du fœtus humain (Fountoulakis *et al.*, 2002).

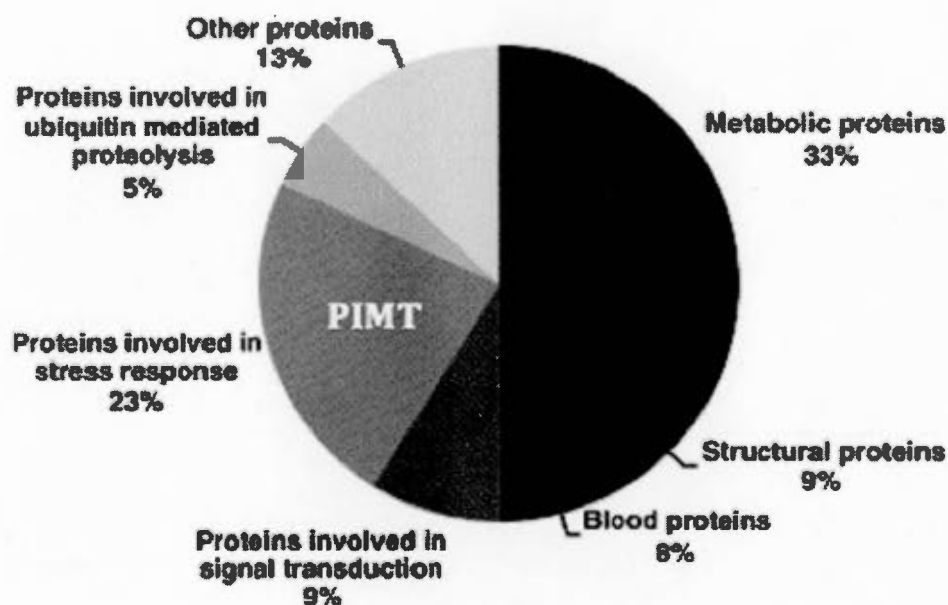




**Figure 1.4** Les différents lobes de l'hémisphère gauche à partir d'une coupe sagittale du cerveau humain (Sandu *et al.*, 2014).

L'activité de la PIMT a été détectée au niveau des synaptosomes (Diliberto et Axelrod, 1976) plus précisément au niveau du cortex cérébral (Witzmann *et al.*, 2005). Elle a également été détectée au niveau du gyrus frontal supérieur et occipital du cortex (Etheridge *et al.*, 2009). De plus, la transmission synaptique était altérée lorsque la PIMT était déficiente dans le cerveau au niveau de la région CA3 de l'hippocampe (Ikegaya *et al.*, 2001). Cela montre l'importance de la PIMT dans la plasticité neuronale mais également dans les fonctions synaptiques. Donc, si la PIMT est mal régulée dans les synaptosomes ou les neurones alors au cours du vieillissement des pathologies du cerveau peuvent se développer (Desrosiers et Fanelus, 2011). Une analyse protéomique a également été faite sur 32 échantillons de la substance blanche. Par la suite, ils ont été séparés sur gel d'électrophorèse 2D et analysés par spectrométrie de masse. Parmi les protéines de la substance blanche, la PIMT a été classée dans le groupe des protéines impliquées dans la

réponse au stress, qui représente le second groupe le plus abondant de la substance blanche (Pozzi Mucelli *et al.*, 2006) (Figure 1.5).



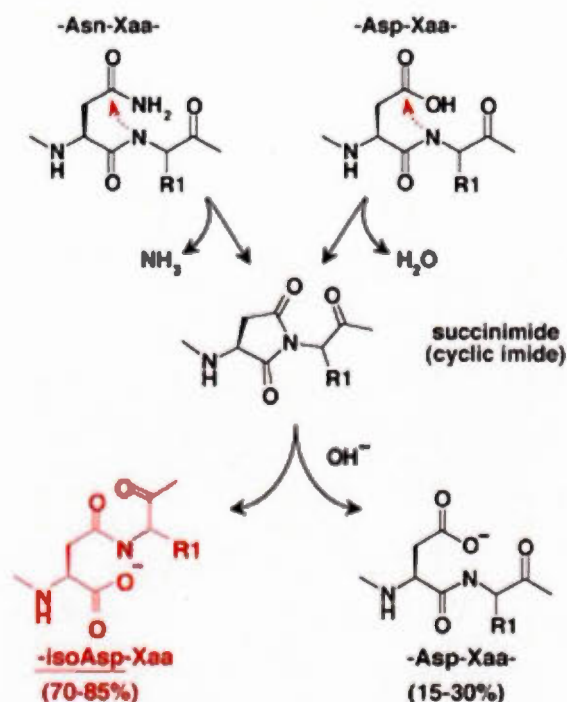
**Figure 1.5** Profil d'expression protéique de la substance blanche (modifiée de Pozzi Mucelli *et al.*, 2006).

#### 1.2.4 La formation des résidus L-isoaspartates

Les protéines subissent des modifications post-traductionnelles qui peuvent changer leur structure et dans la plupart des cas elles deviennent non fonctionnelles (Shimizu *et al.*, 2005). Ainsi, l'apparition de résidus anormaux L-isoaspartates est due à certaines de ces modifications post-traductionnelles spontanées dont l'isomérisation de l'acide aspartique et la désamidation de l'asparagine (Figure 1.6). Dans la majorité des cas, la formation de résidus L-isoaspartates résulte en une perte de fonction de la protéine. Mais, la formation

de résidus L-isoaspartates peut être un gain de fonction notamment au niveau de la séquence Asn-Gly-Arg (NGR) sur la région N-terminale de la fibronectine. En effet, la désamidation de l'asparagine 263 forme une séquence iso-DGR sur la fibronectine qui est reconnue maintenant par l'intégrine  $\alpha v \beta 3$  (Curnis *et al.*, 2006). Il y a également un gain de fonction pour la protéine kinase A (Pepperkok *et al.*, 2000).

La désamidation vient d'une attaque nucléophile de l'atome d'azote du lien peptidique de l'acide aminé suivant en C-terminal. L'isomérisation est due à une déshydratation incluant la chaîne latérale de l'acide aspartique et le lien peptidique de l'acide aminé qui le suit. Un intermédiaire cyclique instable, le succinimide, se forme. Par la suite, il va s'hydrolyser rapidement pour donner un mélange racémique de 15-30 % de résidus L-aspartyls et 70-85 % de résidus L-isoaspartates (Reissner et Aswad, 2003). La différence entre le résidu normal (L-aspartyl) et le résidu anormal (L-isoaspartyl) réside au niveau de la liaison peptidique. Le résidu normal a une liaison peptidique en position  $\alpha$  et le résidu anormal en position  $\beta$  (Murray et Clarke, 1984). La formation de résidus L-isoaspartates peut être favorisée en absence d'encombrement stérique, par exemple, s'il y a un résidu glycine situé après l'acide aspartique ou l'asparagine, la vitesse de formation est 30 à 50 fois plus rapide (Smith *et al.*, 2002).



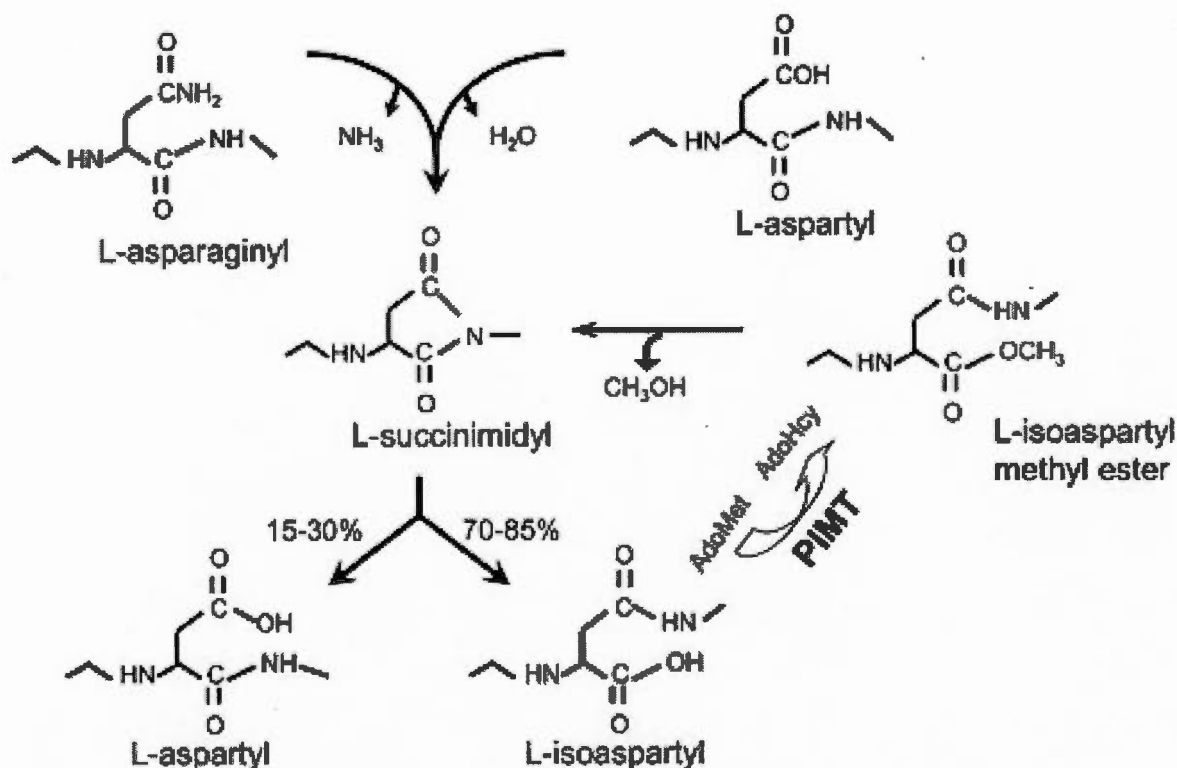
**Figure 1.6** La formation des résidus L-isoaspartates (Reissner et Aswad, 2003).

Il y a d'autres causes qui forment les résidus L-isoaspartates notamment le vieillissement puisqu'une étude sur du plasminogène recombinant humain vieilli *in vitro* dans des conditions physiologiques, pH 7.4 et 37°C, montre que des résidus L-isoaspartates se formaient (Paranandi *et al.*, 1994). Une étude a également été faite sur d'autres protéines qui a montré que les résidus L-isoaspartates s'accumulaient au cours du vieillissement (Desrosiers et Fanelus, 2011). Le stress favorise également la formation de résidus L-isoaspartates. Une étude l'a démontré avec des agents oxydants, tels que *t*-butylhydroperoxyde (t-BHP) ou le peroxyde d'hydrogène, sur des érythrocytes humains (Ingrosso *et al.*, 2000). Le traitement des cellules humaines de glioblastome U-87 MG avec le phénylarsine oxyde a induit la PIMT et lorsque l'enzyme était inhibée par ARN interférent (ARNi) les réactifs de l'oxygène (ROS) étaient générées (Fanelus et Desrosiers,

2008). De plus, la PIMT protégeait contre l'apoptose induite par la dopamine qui génèrent les ROS (Ouazia *et al.*, 2015). Donc, l'expression de la PIMT était régulée par les ROS. Elle est ainsi reconnue comme antioxydante et antiapoptotique.

#### 1.2.5 Mécanisme de réparation de la PIMT

La PIMT est une méthylase qui transfère un groupement méthyle, à partir de l'AdoMet, au niveau de l' $\alpha$ -carboxyle du résidu L-isoaspartate (Aswad, 1984). Ainsi, il y a la formation de la S-adénosyl-homocystéine (AdoHcy) et une liaison méthyle ester qui donne le L-isoaspartylmethyl-ester. Celui-ci va s'hydrolyser rapidement pour redonner le succinimide et c'est à ce moment-là qu'il y a une synthèse du méthanol. La PIMT peut régénérer 15-30 % des résidus normaux lors du premier cycle (Figure 1.7). Il est à noter que la PIMT ne reconnaît pas les résidus normaux L-aspartates (Johnson *et al.*, 1985). Après plusieurs cycles de méthylation par la PIMT, la réparation des protéines endommagées est presque totale (Young *et al.*, 2005). De plus, la réparation est plus favorable que la dégradation d'une protéine puisqu'on compte à peu près une dizaine d'ATP sous forme d'AdoMet pour la réparation contrairement à des milliers d'ATP pour la dégradation (Reissner et Aswad, 2003).



**Figure 1.7** Les mécanismes de formations des résidus L-isoaspartates et réparation de ces dernières par la PIMT (Desrosiers et Fanelus, 2011).

### 1.2.6 Réparation des protéines par la PIMT

La réparation des résidus L-isoaspartates a été observée sur différentes protéines dont la calmoduline qui joue un rôle clé dans la régulation des processus cellulaires dépendant du calcium. *In vitro*, la calmoduline est mise dans des conditions alcalines pour désamider les asparaginines puis a été incubée avec l'AdoMet et la PIMT. Cela a permis la méthylation de 30-50 % de la protéine. La calmoduline native, composée de 40% de résidus L-aspartyl et glycine, n'est pas un substrat pour la PIMT mais le devient lorsqu'elle est altérée et c'est son activité qui est particulièrement touchée (Johnson *et al.*, 1985). En effet, la calmoduline, dans les conditions physiologiques (pH 7.4 et 37°C) perd 82 % de son activité due à la formation des résidus L-isoaspartates mais retrouve 68 % de son activité

après 48 h d'incubation avec la PIMT (Johnson *et al.*, 1987a). D'autre part, des peptides synthétiques qui contiennent des résidus L-isoaspartates et correspondant aux séquences (231-242) du lactate déshydrogénase, (22-27) de la corticotrophine et du peptide d'activation du spermatozoïde ont été réparés *in vitro* par la PIMT purifiée du cerveau de bœuf (Aswad et Deight, 1983; Aswad *et al.*, 1987; Johnson *et al.*, 1987b; Murray et Clarke, 1984). Ainsi, il y avait 80 % de conversion des résidus L-isoaspartates en résidus L-aspartates pour le lactate déshydrogénase après 24 h d'incubation avec la PIMT et 65% de conversion pour les deux autres peptides, le peptide d'activation du spermatozoïde et la corticotrophine, après 48 h d'incubation (Johnson *et al.*, 1987b).

#### 1.2.7 La PIMT est nécessaire au bon fonctionnement du cerveau

L'abondance de la PIMT dans le cerveau a permis de faire un lien avec différentes maladies dont les tumeurs, notamment l'isoforme 2 de la PIMT (Khalil, 2007), la schizophrénie (English *et al.*, 2009), une maladie neurodégénérative dite dégénérescence corticobasal (CBD) (Chen *et al.*, 2005), l'Alzheimer (Desrosiers et Fanelus, 2011) et le Parkinson (Ouazia *et al.*, 2015). C'est l'accumulation de résidus L-isoaspartates au cours du vieillissement qui est néfaste pour la cellule et peut engendrer des dysfonctionnements neurologiques. L'équipe de chercheurs de Yamamoto a observé que les souris déficientes en PIMT (PIMT<sup>-/-</sup>) mourraient à la suite de convulsions épileptiques au bout de 4 à 12 semaines. De plus, il y avait une accumulation de résidus L-isoaspartates. La taille du cerveau des souris PIMT<sup>-/-</sup> augmentait de 25% après 10 semaines et le cerveau présentait des neurones avec des dendrites déformés mais également des microtubules désorganisés comparativement aux souris saines (Yamamoto *et al.*, 1998). Une autre étude a également été faite sur des souris déficientes en PIMT qui a confirmé que ces souris mourraient de crises épileptiques en 42 jours avec une différenciation anormale des neurones laquelle serait due à une activation plus élevée de la voie des MAP kinases ERK puisque Raf-1, MEK et ERK avaient un taux de phosphorylation élevé après une stimulation avec l'EGF (Furuchi *et al.*, 2010). Dans notre laboratoire, une étude a montré qu'il y avait une



réduction de 50% de l'expression et de l'activité de la PIMT chez les patients atteints d'épilepsie, au niveau de l'hippocampe (Lanthier *et al.*, 2002).

La maladie d'Alzheimer, une forme de démence la plus courante chez les personnes âgées, est une maladie neurodégénérative décrite par Alois Alzheimer en 1906. La maladie est due à l'accumulation de plaques séniles extracellulaires au niveau de la région corticale du cerveau ainsi que des vaisseaux sanguins cérébraux. Ces plaques sont composées de peptides de  $\beta$ -amyloïde qui viennent de la protéolyse de la protéine APP (« amyloid precursor protein »). Ce peptide  $\beta$ -amyloïde subit des modifications post-traductionnelles dont la formation de résidus L-isoaspartates. La maladie peut également être issue de la formation de plaques neurofibrillaires (PNF) au niveau des neurones. Ces PNF sont composées de filaments hélicaux pairés (FHP) où l'on retrouve la protéine Tau. Par spectrométrie de masse, les résidus L-isoaspartates ont été détectés au niveau d'Asp 193, Asn 381, Asp 387 sur la protéine Tau de patients atteints d'Alzheimer (Shimizu *et al.*, 2000). De plus, il y avait la présence de 2,7 fois plus de résidus L-isoaspartates dans les protéines Tau des souris déficientes en PIMT (PIMT<sup>-/-</sup>) comparativement aux souris normales (PIMT<sup>+/+</sup>) (Yamamoto *et al.*, 1998). La protéine Tau a également été démontrée étant un substrat de la PIMT (Yamamoto *et al.*, 1998). Ainsi, l'implication de la PIMT est possible dans la maladie d'Alzheimer (Desrosiers et Fanelus, 2011).

#### 1.2.8 Implication de la PIMT dans des voies de signalisation et réponse aux hormones

Au cours du vieillissement, la diminution de certaines hormones dont l'œstradiol et le facteur de croissance de l'insuline IGF-1 peut avoir des répercussions néfastes pour le fonctionnement du cerveau puisqu'elles interagissent ensemble pour la neuroprotection. Elles ont un effet synergique sur l'activation de l'Akt qui diminue l'activité de GSK-3 et active la survie des neurones (Garcia-Segura *et al.*, 2007). Récemment, dans notre laboratoire, il a été rapporté que la PIMT était activée par l'acide valproïque et le lithium, utilisés comme stabilisateurs de l'humeur pour le trouble bipolaire. Ces expériences ont été faites sur deux lignées cellulaires, les astrocytomes U-87 MG et les neuroblastomes SH-



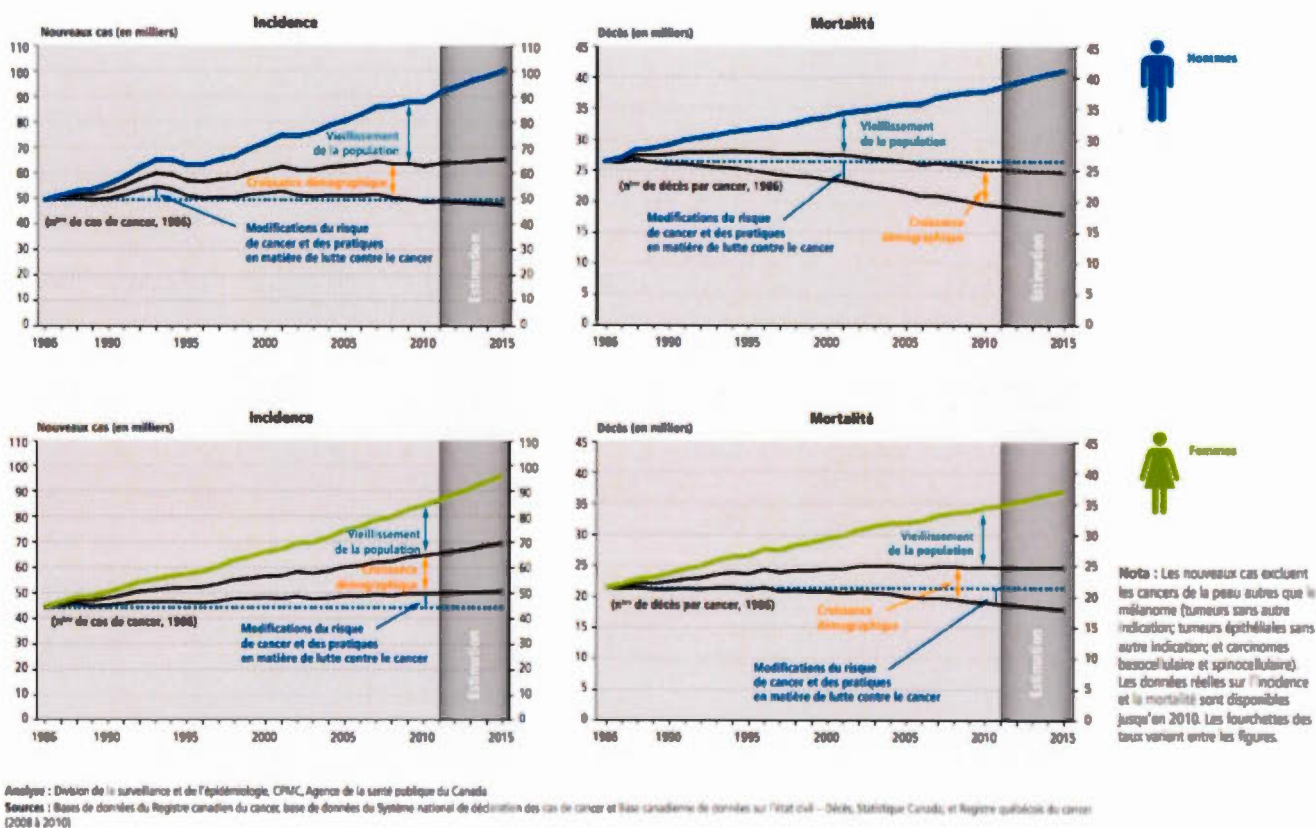
SY5Y. Ces expériences ont montré que la  $\beta$ -caténine activait la synthèse de la PIMT par la voie de signalisation ERK/RSK-1/GSK-3 $\beta$ / $\beta$ -caténine (Cournoyer et Desrosiers, 2009; Lamarre et Desrosiers, 2008). D'ailleurs, l'équipe de Yamamoto a injecté à des souris déficientes en PIMT (PIMT  $-/-$ ) de l'acide valproïque et il y avait une augmentation de la survie des souris (Yamamoto *et al.*, 1998). Les protéines GSK-3 et  $\beta$ -caténine sont également impliquées dans la voie de signalisation de Wnt, laquelle est importante dans le développement du cerveau (Brault *et al.*, 2001; Spittaels *et al.*, 2002). De plus, la  $\beta$ -caténine inactive résultait en une malformation cérébrale (Brault *et al.*, 2001) et GSK-3 diminue la taille du cerveau (Spittaels *et al.*, 2002). D'où, le lien possible de la PIMT dans le développement cérébral.

### 1.3 Cancer : généralité

Malgré des recherches médicales avancées, le cancer reste un fléau mondial. On compte 24 millions de personnes atteintes dont 6 millions de morts chaque année et on estime qu'entre 2000 et 2050 le nombre de diagnostics d'un cancer va doubler (Li *et al.*, 2012). Par exemple, aux États-Unis, en tenant compte de l'incidence et de la survie, il a été estimé qu'entre 2010 et 2020 le nombre de survivants d'un cancer sera de 13,8 à 18,1 millions. En 2010, le coût des traitements était entre 124,57 et 157,77 milliards de dollars. D'ici 2020, l'on suppose une augmentation de 39 % comparativement à 2010 (Mariotto *et al.*, 2011).

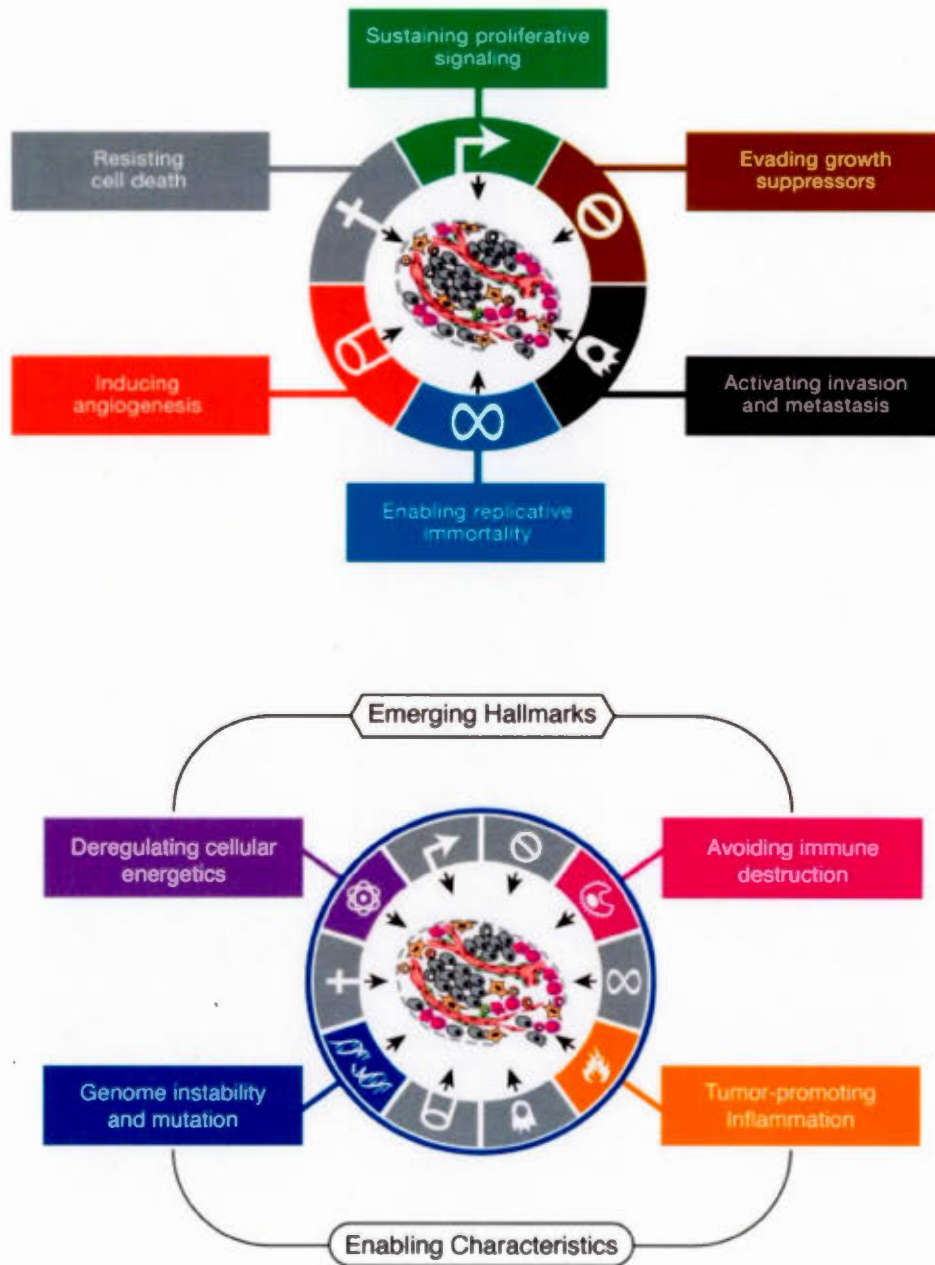
Au Canada, on estime que la probabilité chez l'homme de développer un cancer est de 45% et chez la femme de 42% au cours de leur vie et qu'environ 25% va en mourir. Chaque heure, 22 personnes reçoivent un diagnostic du cancer au Canada. En 2011, les bases de données de Statistiques Canada ont montré que le cancer était la première cause de décès (30% de tous les décès). En 2015, on a supposé qu'il y aura 196 900 nouveaux cas de cancer et 76 500 décès (Comité consultatif de la Société canadienne du cancer, 2015) (Figure 1.8). En 2008, les analyses de l'Agence de la santé publique du Canada ont déterminé les coûts qui s'élèvent à 4,4 milliards de dollars. Dans les années à venir, on

estime en tenant compte du vieillissement de la population et de la croissance démographique qu'il y aura une augmentation de personnes atteintes de cancers (Comité consultatif de la Société canadienne du cancer, 2015).



**Figure 1.8** Tendances de l'incidence ainsi que de la mortalité des femmes et des hommes de tous âges atteints de tous types de cancers associés aux modifications du risque du cancer et des pratiques de lutte contre le cancer, mais aussi à la croissance démographique et du vieillissement de la population de 1986 à 2015 (Comité consultatif de la Société canadienne du cancer, 2015).

Les dix caractéristiques fondamentales d'une cellule cancéreuse ont été définies par les deux chercheurs Douglas Hanahan et Robert Weinberg dans l'article nommé « *Hallmarks of Cancer* » dans la revue scientifique *Cell* (Figure 1.9). Ainsi en 2000, ils ont défini six caractéristiques dont l'autosuffisance en signaux de croissance, l'insensibilité aux signaux qui inhibe la croissance, résistance à l'apoptose, la propriété de se diviser indéfiniment, l'induction de l'angiogenèse et la capacité de faire des métastases. En 2011, ils ont mis à jour l'article nommé « *Hallmarkers of Cancer : The Next Generation* » et ils ont ajouté d'autres caractéristiques. Il y a les caractéristiques émergentes qui comprennent une dérégulation du métabolisme énergétique de la cellule et l'échappement au système immunitaire. Enfin, les caractéristiques permissives comprenant l'instabilité génomique de la cellule cancéreuse et l'inflammation promotrice (Hanahan et Weinberg, 2000, 2011).



**Figure 1.9** Les dix caractéristiques biologiques les plus connues d'une cellule cancéreuse (Hanahan et Weinberg, 2000, 2011).

### 1.3.1 Les tumeurs cérébrales

Les tumeurs cérébrales sont dues à une prolifération anarchique des cellules du cerveau. Il y a les tumeurs primitives qui regroupent en majorité les gliomes dont les astrocytomes et les oligodendrocytomes. Les astrocytes ont une forme étoilée et assurent la nutrition des neurones (Baudrimont, 1991). D'après l'organisation mondiale de la santé (OMS), les astrocytomes sont classés selon quatre grades (Tableau 1). Les causes de ces tumeurs sont encore mal connues d'où la nécessité des recherches plus approfondies.

**Tableau 1** Classification par l'OMS en 2007 des différents grades d'astrocytomes (Louis *et al.*, 2007).

Astrocytome de grade I	Astrocytome pilocytique Tumeur de bas grade et différencié Croissance lente Récidive rare Le moins malin Curable par chirurgie
Astrocytome de grade II	Tumeur de bas grade Diffus Différenciation intermédiaire Croissance lente Mitose très faible Absence de nécrose Absence de prolifération vasculaire Récidive Métastases possibles

Astrocytome de grade III	Peu différencié Tumeur de haut grade Astrocytome anaplasique Croissance rapide Augmentation de la densité cellulaire Pléiomorphisme cellulaire Mitose Aucune néovascularisation Aucune nécrose Récidive avec un haut grade Métastases
Astrocytome de grade IV	Indifférencié et anaplasique Tumeur de haut grade Astrocytome polymorphe Croissance rapide Forte densité cellulaire Pléiomorphisme cellulaire Mitose typique ou atypique Fortement vascularisé Le plus agressif et malin Nécrose Métastases (atteint les tissus voisins profondément)



### 1.3.2 Les glioblastomes multiformes

Les glioblastomes multiformes sont classés, d'après l'OMS, astrocytomes de grade IV, sous l'abréviation de GBM (Figure 1.10). Ils sont très agressifs et fortement vascularisés avec des régions très hypoxiques et associées à des nécroses (Beasley et Toms, 2011; Brat et Mapstone, 2003). Il y a différentes origines, 90% sont d'origine primaire et 10 % sont d'origine secondaire provenant de grade inférieur. Morphologiquement, on ne peut les distinguer. Par contre, ils ont un profil génétique différent. Les personnes atteintes ont en général entre 40 et 70 ans (Urbanska *et al.*, 2014). En Amérique du Nord, chaque année, 2-3 adultes sur 100 000 sont atteints (Verdecchia *et al.*, 2002) avec une incidence plus élevée chez les hommes que les femmes (1.26/1) (Mahvash *et al.*, 2011) et 1.1 à 3.6 d'enfants atteints sur 100 000 (Winters *et al.*, 2001). La recherche pour trouver des cibles thérapeutiques est d'autant plus importante puisque la survie moyenne d'un patient atteint est de 4,5 à 15 mois et varie selon si le patient reçoit un traitement tels que la chirurgie, la radiothérapie ainsi que la chimiothérapie (Luo *et al.*, 2015).

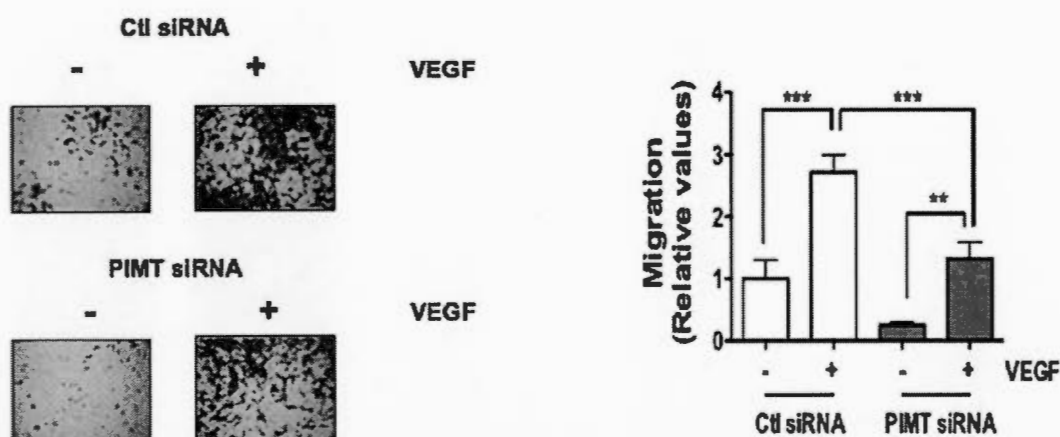


**Figure 1.10** Une coupe axiale du cerveau qui représente un glioblastome multiforme par résonnance magnétique (Brat et Mapstone, 2003).

#### 1.4 L'implication de la PIMT dans le cancer

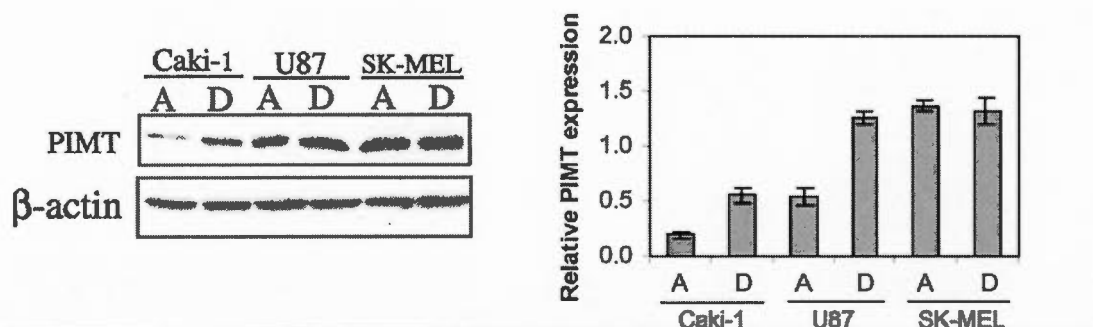
La régulation de la PIMT est très peu connue dans le développement des tumeurs. Il est connu que les tumeurs peuvent induire de nouveaux vaisseaux sanguins, processus appelé angiogenèse en synthétisant leur propre facteur de croissance des vaisseaux sanguins (VEGF) (Ferrara, 2002). Récemment, dans notre laboratoire, il a été démontré que le niveau de PIMT était augmenté lorsque les cellules endothéliales, dont les cellules endothéliales humaines de veines ombilicales (HUVEC), étaient détachées de la matrice extracellulaire (Lanthier et Desrosiers, 2006). Une autre étude a démontré que la PIMT induit également la migration des cellules endothéliales par son activité catalytique. En effet, lorsque les cellules HUVEC étaient transfectées par ARNi dirigé contre la PIMT il y avait une inhibition de la migration cellulaire (Figure 1.11). De même, l'ARNi dirigé contre la PIMT bloquait la formation de nouveaux vaisseaux sanguins malgré une stimulation au VEGF. Par contre, lorsque la forme sauvage de la PIMT était surexprimée, il y avait une induction de la migration cellulaire en présence du VEGF. Lorsque les cellules étaient transfectées avec la forme mutée et inactive de la PIMT, PIMT (D83V), il n'y avait aucun effet. D'où l'importance de l'activité catalytique pour réguler la réponse au VEGF dans la migration des cellules endothéliales lors de l'angiogenèse. Cela emmène à une nouvelle fonction de la PIMT dans l'angiogenèse en tant qu'enzyme pro-angiogénique et l'angiogenèse est un processus essentiel dans la croissance tumorale pour l'apport de la nutrition et de l'oxygène aux cellules cancéreuses (Ouanouki et Desrosiers, 2016).





**Figure 1.11** L'inhibition de la PIMT diminue la migration des cellules endothéliales humaines de veines ombilicales dépendantes du VEGF (Ouanouki et Desrosiers, 2016).

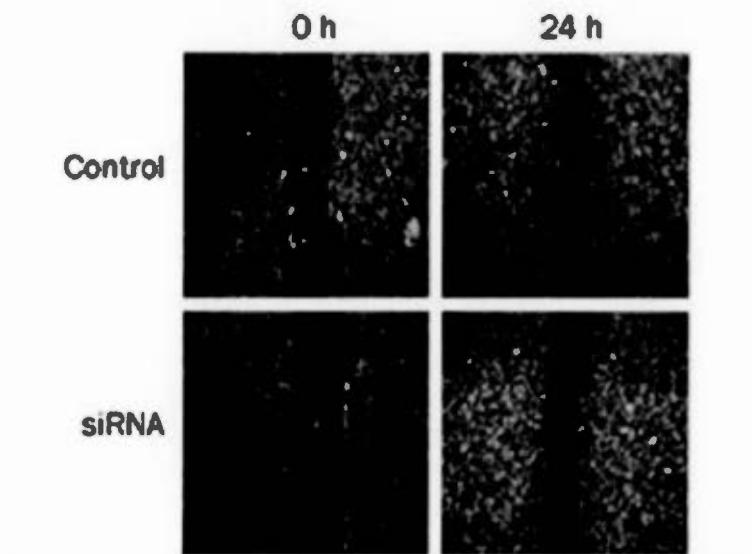
De plus, il a été démontré dans notre laboratoire dans différentes lignées, les cellules cancéreuses humaines rénales (Caki-1) et astrocytomes humains (U-87 MG), que le niveau de PIMT était augmenté rapidement lorsqu'elles étaient détachées de la matrice extracellulaire (Figure 1.12). Inversement, elles diminuaient lorsque les cellules se réattachent à la matrice extracellulaire dont les astrocytomes humains U-87 MG. Des études plus approfondies ont montré que l'intégrine  $\alpha\beta3$  serait impliquée dans la régulation de la PIMT. Ainsi, lorsque les cellules sont attachées à la matrice extracellulaire, elles sont en contact avec cette intégrine qui active la voie PI3K et permet la dégradation de la PIMT par le protéasome (Lanthier et Desrosiers, 2006). Les intégrines sont connues pour permettre l'interaction avec la matrice extracellulaire nécessaire à l'adhérence, la survie cellulaire, la prolifération, la différenciation, ainsi que la migration. L'intégrine  $\alpha\beta3$  est également très fortement exprimée à la surface des cellules endothéliales et elle régulerait ainsi leur prolifération et leur migration (Ruegg et Mariotti, 2003). Ces résultats ont suggéré que la PIMT peut jouer un rôle pendant l'angiogenèse, le développement tumoral et la formation de métastases.



**Figure 1.12** L'expression de la PIMT dans différentes lignées cancéreuses dont les cellules cancéreuses humaines rénales (Caki-1), astrocytomes humains (U-87 MG) et mélanomes (SK-MEL-28), lorsqu'elles sont attachées (A) ou détachées (D) de la matrice extracellulaire (Lanthier et Desrosiers, 2006).

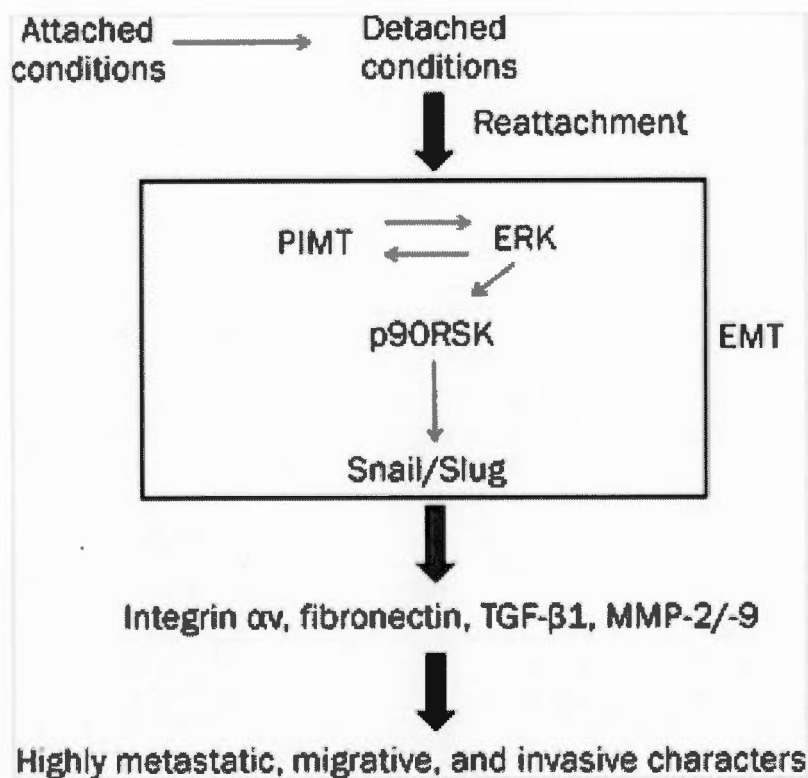
#### 1.4.1 La PIMT dans la migration des cellules cancéreuses du sein

D'autres études ont appuyé les résultats obtenus dans notre laboratoire puisqu'une hausse du niveau de PIMT était observée lorsque les cellules cancéreuses du sein MDA-MB-231 étaient détachées de la matrice extracellulaire (Ryu *et al.*, 2011). Ces résultats ont appuyé le rôle oncogénique de la PIMT. La métastase est due à des cellules cancéreuses détachées, résistant à l'anoikis, qui migrent vers les voies lymphatiques et les vaisseaux sanguins pour atteindre un nouveau foyer. Les chercheurs ont montré l'implication de la PIMT dans la migration des cellules MDA-MB-231 (Figure 1.13) (Ryu *et al.*, 2011). De plus, la PIMT est connue pour être antiapoptotique puisque la surexpression de la PIMT protège les cellules astrocytaires contre l'apoptose induite par Bax (Huebscher *et al.*, 1999) mais également les neuroblastomes SH-SY5Y contre les réactifs de l'oxygène (ROS) induites par la dopamine (Ouazia *et al.*, 2015). Cela suggère que la PIMT favorise la survie des cellules cancéreuses pendant la migration et l'invasion.



**Figure 1.13** L'inhibition de la PIMT par ARN interférent (siRNA) diminue la migration des cellules cancéreuses du sein MDA-MB-231 (Ryu *et al.*, 2011).

Ces chercheurs sont allés comprendre un peu plus le mécanisme de régulation de la PIMT dans les cellules cancéreuses du sein MDA-MB-231 en se focalisant sur la transition épithéliale mésenchymateuse (EMT). La transition épithéliale est un processus qui modifie la forme, l'adhérence et le mouvement des cellules. Ainsi, les cellules épithéliales acquièrent les caractéristiques des cellules mésenchymateuses qui est un processus important pour la progression des tumeurs. Ces chercheurs ont découvert que la PIMT serait en corrélation avec la voie ERK qui résulte d'une augmentation des facteurs de transcription Snail/Slug et des composés de la matrice extracellulaire sur l'intégrine  $\alpha_v$ , responsables du développement tumoral (Figure 1.14). La PIMT est aussi en lien avec l'activation des métalloprotéinases MMP-2/9 responsables de la dégradation de la matrice extracellulaire pour favoriser l'invasion des cellules cancéreuses (Ryu *et al.*, 2011).



**Figure 1.14** Schéma du processus EMT lors du détachement et réattachement des cellules cancéreuses MDA-MB-231 (Ryu *et al.*, 2011).

#### 1.4.2 La PIMT régule la p53

Un groupe de chercheurs a découvert que la PIMT avait bien plus qu'un rôle de réparation. En effet, ils ont découvert que la PIMT régule l'activité de p53, un suppresseur de tumeur, en méthylant les résidus L-isoaspartyls en position 29 et 30 sur différentes lignées cellulaires cancéreuses dont les neuroblastomes SH-SY5Y et les ostéosarcomes U2OS (Lee *et al.*, 2012). La forme méthylée de p53 se lie avec HDM2, une ubiquitine ligase. Ainsi, la protéine p53 méthylée et ubiquitinée est envoyée au protéasome pour y être dégradée. Cela résulte à une diminution de son expression et donc de l'activité de p53.

Cette découverte peut également emmener à postuler que la PIMT peut avoir un rôle oncogénique (Lee *et al.*, 2012).

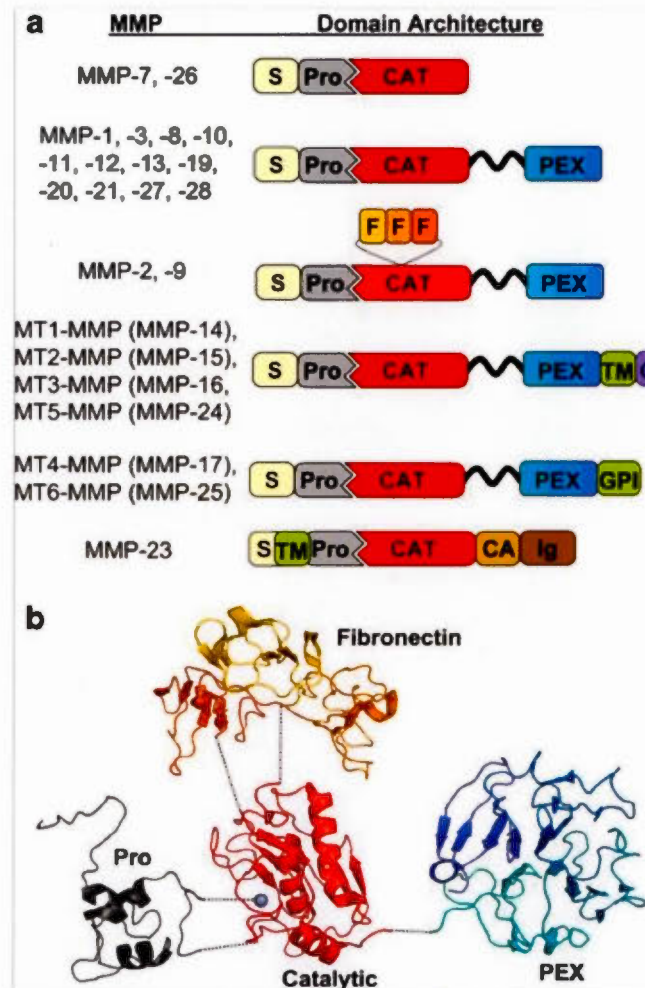
#### 1.4.3 L'implication de la PIMT avec la matrice extracellulaire

Les protéines de la matrice extracellulaire ont tendance à accumuler des résidus L-isoaspartates due à leur demi-vie longue (Lindner et Helliger, 2001). Le collagène de type I, protéine présente dans la matrice extracellulaire, est responsable de l'adhésion ainsi que de la migration (Staatz *et al.*, 1991). Le collagène de type I de rats âgés de 20 mois accumulait beaucoup de résidus L-isoaspartates comparativement à celui des rats âgés de 3 mois. L'incubation *in vitro* de ces collagènes de type I avec la PIMT permettait leur réparation. Par la suite, la migration cellulaire augmentait. La PIMT restaurait à 72 % la migration des cellules cancéreuses humaines rénales Caki-1 sur du vieux collagène. Ceci démontre que la PIMT a la capacité de réparer les protéines de la matrice extracellulaire. Ainsi, la PIMT peut jouer un rôle de régulation encore une fois dans la capacité migratoire des cellules cancéreuses (Lanthier et Desrosiers, 2004). D'autre part, la formation de résidus L-isoaspartates par la désamidation de l'asparagine 263 sur la région NGR de la fibronectine en N-terminal donne un site iso-DGR qui génère un site de liaison à l'intégrine  $\alpha\beta 3$ . L'isonectin-1, un peptique synthétique analogue à la fibronectine isomérisée, inhibe l'adhésion des cellules endothéliales *in vitro*. De plus, l'isonectin-1 administré tous les jours à des souris porteuses de lymphome RMA, lignée murine de lymphomes, inhibait la croissance tumorale (Curnis *et al.*, 2006).

La PIMT, normalement intracellulaire, n'a pas accès aux protéines extracellulaires pour les réparer. Ainsi, plus de 90 % des protéines de la matrice extracellulaire contenaient des résidus aspartyls anormaux (Weber et McFadden, 1997). Cependant, lors d'un dommage cellulaire, par exemple au niveau des cellules de l'aorte thoracique et de la veine cave supérieur, des substrats méthylés ont été retrouvés au niveau de ces tissus suggérant que la PIMT a été libérée dans la matrice extracellulaire (Weber et McFadden, 1997).

## 1.5 Les métalloprotéases

Les métalloprotéases matricielles (MMPs) ont beaucoup été mises en avant dans le développement des tumeurs. Elles font partie de la famille des endopeptidases dépendantes du zinc. Elles sont impliquées dans le remodelage de la matrice extracellulaire, dans le développement embryonnaire mais aussi dans la dégradation de la matrice extracellulaire. Les métalloprotéases permettent l'invasion des cellules cancéreuses et sont présentes dans tous les cancers humains. Il existe différentes classes de MMPs, 17 de types enzymes solubles et 6 de types membranaires. Il y a ainsi les gélatinases (2 et 9), collagénases (1, 8, 13 et 18), stomélysines (3, 10, 11 et 12), matrilysines (7 et 26) et enfin les métalloprotéases membranaires dont MT1-MMP (Figure 1.15) (Cathcart *et al.*, 2015). Les MMPs sont connues pour influencer l'environnement des cancers en favorisant l'angiogenèse, le développement de la tumeur et les métastases (Kalluri et Zeisberg, 2006; Radisky et Radisky, 2010). L'activité des métalloprotéinases est régulée par des modifications post-traductionnelles. Les gélatinases MMP-2 et 9 se lient à différentes protéines de la matrice extracellulaire dont la gélatine, le collagène, la fibronectine et la laminine (Allan *et al.*, 1995). Il a été démontré qu'une expression accrue des MMPs dont les MMP-2 était liée à une hausse de la prolifération des cellules cancéreuses ainsi que de la taille de la tumeur (Liu *et al.*, 2006).



**Figure 1.15** Structure du domaine MMP (a) et le repliement de pro-MMP-2 (b) (S : signal peptidique, Pro: propetidique, CAT: domaine catalytique, F: fibronectine, PEX: domaine hémopexine, TM: domaine transmembranaire, GPI: ancrage de la membrane glycophosphatidylinositol, C: domaine cytosolique, CA: cystéine, Ig: domaine de l'immunoglobuline) (Radisky et Radisky, 2010).

## 1.6 Objectifs de recherche

La PIMT est une protéine relativement abondante dans le cerveau et elle répare les protéines endommagées qui contiennent des résidus L-isoaspartates. L'implication de la PIMT dans le développement des tumeurs est très peu explorée et encore moins dans les glioblastomes multiformes. Les glioblastomes multiformes sont des tumeurs cérébrales très agressives et très vascularisées. De plus, la survie des patients est de 4,5 à 15 mois en moyenne et aucun traitement efficace n'est connu à ce jour d'où la nécessité de trouver de nouvelles cibles thérapeutiques innovantes. Des études ont démontré des caractères oncogéniques de l'enzyme PIMT. Elle est capable de réparer les protéines de la matrice extracellulaire qui présentent des résidus L-isoaspartates ce qui favorisent la migration cellulaire. Elle régule également, par son action de méthylation, la protéine p53, un suppresseur de tumeur, en l'envoyant au protéasome. Des recherches précédentes ont démontré que la PIMT est antiapoptotique et que son expression était élevée dans différentes lignées cancéreuses dont les cellules U-87 MG. Les relations entre ces recherches permettent de voir l'implication de la PIMT dans la survie et l'invasion des cellules cancéreuses. Elle est aussi impliquée dans le processus angiogénique, important dans l'apport nutritif et l'oxygénation des cellules cancéreuses. Ces différents caractères phénotypiques permettent d'établir l'hypothèse que la PIMT peut jouer un rôle pour favoriser la migration des cellules cancéreuses du cerveau. L'étude a été faite sur la lignée en culture de cellules cancéreuses du cerveau humain, les glioblastomes U-87 MG, modèle type des glioblastomes multiformes. Pour démontrer notre hypothèse, les objectifs ont été les suivants : Les essais de migration ont été faits soit 1) lors de l'inhibition de l'expression de la PIMT par ARNi, soit 2) avec des lignées stables surexprimant la forme sauvage ou une forme mutée et inactive de la PIMT pour voir l'implication de l'activité catalytique de l'enzyme. Différents essais de migration, « Wound Healing », chambres de Boyden avec gélatine ou Matrigel, ont été utilisés pour analyser le rôle de la PIMT.



Les essais de migration ont été faits soit lors de l'inhibition de l'expression de la PIMT par ARNi soit avec des lignées stables surexprimant la forme sauvage ou une forme mutée et inactive de la PIMT pour voir l'implication de l'activité catalytique de l'enzyme.

## CHAPITRE II

### MATÉRIELS ET MÉTHODES

#### 2.1 Matériels

La lignée cellulaire humaine U-87 MG d'astrocytomes de grade IV provient de Cedarlane Laboratories LTD (Burlington, ON, Canada). Les lignées stables ont été établies dans notre laboratoire en transfectant les cellules U-87 MG avec le plasmide pCMV6 qui provient d'Origene (Rockville, MD, États-Unis). Les différentes constructions des plasmides, pCMV6 vide (témoin), pCMV6-PIMT qui surexprime la forme sauvage de la PIMT et pCMV6-PIMT (D83V) qui surexprime la forme inactive et mutée de la PIMT, ont été extraites des bactéries *E. Coli* grâce à la trousse mini Prep qui provient de Qiagen (Valencia, CA, États-Unis). Le sérum est de Hyclone Laboratories (Logan, UT, États-Unis). Le cocktail d'inhibiteurs de protéases provient de Calbiochem (La Jolla, CA, États-Unis). Les ARN interférents contrôles non spécifiques et ceux dirigés contre la PIMT ont été fournis par Qiagen (Valencia, CA, États-Unis). L'agent de transfection, la Turbofectine 8.0, provient de Cedarlane (Burlington, ON, Canada) et la lipofectamine 2000 d'Invitrogen (Burlington, ON, Canada). L'antibiotique G418 provient de Wisent (St Bruno, Qc, Canada). L'ECL provient de Denville Scientific (Saint-Laurent, Qc, Canada). L'anticorps polyclonal de lapin dirigé contre la PIMT (24.5 kDa) a été produit et purifié par l'Institut de recherche en biotechnologie (Montréal, QC, Canada). L'anticorps dirigé contre l' $\alpha$ -tubuline provient de Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, États-Unis). L'anticorps anti-lapin IgG a été obtenu de Jackson Immuno Research (West Grove, PA, États-Unis). La trousse du test de viabilité cellulaire au 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium bromide (MTT) provient d'Invitrogen (Burlington, ON, États-Unis). Le Matrigel provient de Fisher Scientific (Ottawa, ON, États-Unis). Les chambres de Boyden stériles avec des pores polycarbonates (8  $\mu$ m) adaptés pour 24 puits ont été achetées chez Costar (Oakville, ON, CA).

## 2.2 Méthodes

### 2.2.1 Culture cellulaire

La lignée d'astrocytomes U-87 MG a été cultivée dans le milieu *modified Eagle's medium* (MEM) (Wisent, Saint-Bruno, QC, Canada) complété avec 1 mM de pyruvate de sodium et 10% de sérum bovin fœtal (FBS). Les cellules ont été cultivées dans des conditions physiologiques à 37 °C et 5 % CO<sub>2</sub>/95 % O<sub>2</sub>.

### 2.2.2 Transfection des cellules U-87 MG avec un ARN interférent dirigé contre la PIMT

Dans des plaques à 6 puits, 100 000 cellules U-87 MG ont étéensemencées par puit. Après 30 à 50 % de confluence, les cellules U-87 MG ont été transfectées avec des ARNi en utilisant un agent de transfection, la lipofectamine 2000. Les ARNi ont été soit dirigé contre la PIMT (siPIMT) soit non spécifique (siCTL). Les mélanges ont été incubés 45 min à température pièce puis incorporés aux cellules pour avoir une concentration finale de 40 nM d'ARNi. Par la suite, les cellules transfectées ont été incubées pendant 72 h à 37°C, dont un changement du milieu contenant du sérum après 24 h.

### 2.2.3 Transfection des cellules U-87 MG avec des plasmides

Différentes constructions de la PIMT clonées dans le plasmide pCMV6 ont été amplifiées dans des bactéries *E. Coli* selon le protocole décrit précédemment (Ouazia *et al.*, 2015). L'ADN plasmidique a été extrait grâce à une colonne Qiagen avec la trousse mini Prep selon le protocole de la compagnie Qiagen. Le gène *Pcmt1* humain intégré dans le plasmide pCMV6 code pour l'isoforme I de la PIMT. Le plasmide pCMV6-PIMT (D83V) qui exprimait la PIMT inactive et mutée est dû à la mutation de l'acide aspartique (D) par la valine (V) en position 83 au niveau du site catalytique de l'enzyme (Cimmino *et al.*, 2008). Le témoin utilisé est le plasmide vide pCMV6 dont les cellules exprimaient seulement la PIMT endogène. Par la suite, dans des plaques à 6 puits, 100 000 cellules ont étéensemencées et incubées pendant 48 h à 37°C puis 1 µg d'ADN a été ajouté aux cellules U-87 MG avec l'agent de transfection, la Turbofectine 8.0, selon le protocole décrit dans le

manuel d'utilisation de la compagnie OriGene. La transfection a duré 48 h à 37°C. Pour la suite des expériences, des lignées stables ont été établies, pCMV6 vide, pCMV6-PIMT et pCMV6-PIMT (D83V), en ajoutant 400 µg/ml d'antibiotique G418 pour la sélection des cellules porteuses du plasmide et 200 µg/ml pour maintenir les lignées stables.

#### 2.2.4 Test de prolifération et viabilité cellulaire

La viabilité cellulaire a été mesurée grâce à la trousse MTT. Pour cela, 5000 cellules U-87 MG ont été ensemencées dans des microplaques à 96 puits. Après 72 h (lignées transitoires), ou 80 % de confluence (les lignées stables), le milieu a été aspiré et remplacé avec du milieu sans sérum. Ensuite, les cellules ont été incubées avec 10 µl de MTT (12 mM) pendant 4 h à 37°C. Pour lyser les cellules, un volume de 100 µl de SDS-HCl (0,01 M) a été ajouté aux cellules U-87 MG. Les cellules ont été incubées 4 h à 37°C. La lecture de l'absorbance a été faite à 570 nm avec un lecteur de microplaques.

#### 2.2.5 Lyse cellulaire

Les cellules U-87 MG ont été lavées avec du tampon phosphate salin PBS (150 mM NaCl, 2,7 mM KCL, 1,3 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 8,1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O à pH 7.4) sans Ca<sup>2+</sup> et sans Mg<sup>2+</sup>. Les cellules ont été lysées avec du tampon de lyse RIPA (50 mM Tris-HCL à pH 7.5, 150 mM NaCl, 0,1% SDS, 1% Nonidet P-40, 0,5 % Deoxycholate), 1 mM de fluorure de sodium NaF, du vanadate de sodium Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> et un cocktail d'inhibiteurs à protéases. Les lysats cellulaires ont été laissés sur glace pendant 30 min et la récolte protéique s'est faite en prélevant les surnageants après centrifugation à 10 000 g pendant 10 minutes à 4°C.

#### 2.2.6 Electrophorèse SDS-PAGE et buvardage de type Western

Les protéines ont été dosées selon la méthode de micro-BCA de Pierce (Rothford IL, États-Unis). Ensuite, 15 µg de protéines ont été mélangées avec un tampon d'échantillons pour électrophorèse (62,5 mM Tris/HCl à pH 6.8, 10 % de glycérol, 2 % SDS, 5 % β-mercaptoéthanol et 0,00625 % de bleu de bromophénol), puis chauffés à 100°C pendant 4 minutes. Les échantillons ont été déposés sur un gel polyacrylamide composé de

deux phases : entassement et séparation. Le gel de séparation contient 12,5 % d'acrylamide, 0,3 % de N,N-méthylène-bis-acrylamide, 0,375 M de Tris/HCl à pH 8.8, 0,1 % de SDS, 0,5 µl/ml de TEMED et de 0,5 mg/ml d'APS. Le gel d'entassement contient 3,8 % d'acrylamide et 0,1 % N,N-méthylène-bis-acrylamide, 0,125 M de Tris/HCl pH 6.8, 0,1% de SDS, 1 µl/ml de TEMED et 0,5 mg/ml d'APS. La migration a été faite à 105 volts pendant 30 minutes puis 130 volts pendant 1 h. Par la suite, les protéines ont été transférées sur une membrane de polyvinylidène difluorure (PVDF). Cette membrane a été incubée dans du méthanol, de l'eau et du tampon de transfert (96 mM glycine, 10 mM Tris et 10 % de méthanol). Le transfert des protéines a été effectué pendant 1 h. Enfin, une incubation pendant une heure dans du tampon de blocage Tris salin (TBS) (150 mM NaCl, 20 mM Tris/HCl à pH 7.5) contenant 0,1% de Tween-20 et 5 % de lait en poudre a été fait.

## 2.2.7 Immunodétection des protéines

Les membranes PVDF ont été lavées trois fois dans du TBS-Tween 20 (0,3 %) pendant 15 min. Les membranes PVDF ont été incubées toute la nuit à 4°C avec l'anticorps primaire contre la PIMT ou l' $\alpha$ -tubuline selon la détection voulue. L'anticorps  $\alpha$ -tubuline a été dilué dans 1 :1000 et celui de la PIMT 1 :200 000 dans du TBS avec 0,1 % de Tween 20 et 5 % d'albumine de sérum bovin (BSA), excepté pour l'anticorps PIMT. Les membranes PVDF ont été encore lavées trois fois pendant 15 minutes comme précédemment et incubées avec l'anticorps secondaire anti-lapin IgG couplé à la peroxydase dilué 1 :2500 dans du TBS-Tween 20 (0,1 %) et 5 % de lait. Puis, les membranes PVDF ont été agitées pendant 1 minute dans l'ECL qui permet de détecter les anticorps par le signal de chimioluminescence. Enfin, les membranes PVDF ont été exposées dans des films Fuji pour immunodétecter les protéines spécifiques dans la chambre noire. Finalement, l'analyse et les quantifications des protéines ont été faites grâce à des logiciels spécifiques tels que TotalLab et image J Software.

### 2.2.8 Essai de migration : « Wound Healing »

Pour voir l'effet de l'inhibition de la PIMT sur la migration cellulaire, une technique expérimentale utilisée lors d'un essai de cicatrisation (« Wound Healing ») a été faite. Après avoir transfecté les cellules U-87 MG avec les ARNi (siCTL et siPIMT) ou les plasmides (pCMV6 vide, pCMV6-PIMT, pCMV6-PIMT (D83V)), différentes conditions ont été optimisées. Une rayure a été faite sur la monocouche cellulaire avec un embout P200 stérile. Au temps 0, un groupe de cellules a été lavé avec du milieu et du PBS, puis les cellules ont été fixées 10 minutes avec du formaldéhyde (10 %) et colorées pendant 10 minutes au Crystal violet (0,1 %) dissous dans 20 % de méthanol. Un autre groupe de cellules a migré 24 h puis les cellules ont subi les mêmes traitements de lavage, de fixation et de coloration que celles au temps 0. Les cellules qui avaient migré ont été observées au microscope optique à un grossissement 40 X et photographiées (Caméra Retiga 1300 et microscope Nikon modèle TE2000-U) à différents temps (T=0 h et T=24 h). L'analyse quantitative correspond à l'aire où les cellules ont migré et elle représente au minimum trois expériences indépendantes. Les résultats sont significatifs d'après le test t de student ou par analyse de la variance Anova suivie du test Newman Keuls.

### 2.2.9 Essai de migration : Chambres de Boyden

Les chambres de Boyden avec filtres de polycarbonates (diamètre des pores de 8  $\mu\text{m}$ ) ont été mises dans des plaques à 24 puits. Elles ont été recouvertes de gélatine à 0,15 % diluée dans du PBS, 100  $\mu\text{l}$  dans la chambre supérieure et 600  $\mu\text{l}$  dans la chambre inférieure, et laisser à 4°C toute la nuit. Les chambres de Boyden ont été lavées avec du PBS froid puis 50 000 cellules des différentes conditions, transfectées avec les ARNi (siCTL et siPIMT) ou les plasmides (pCMV6 vide, pCMV6-PIMT, pCMV6-PIMT (D83V)), ont été ensemencées dans la chambre supérieure dans un volume final de 100  $\mu\text{l}$ . Un volume de 600  $\mu\text{l}$  de milieu avec sérum a été ajouté dans la chambre inférieure comme chémoattractant. Ensuite, les cellules ont été incubées à 37°C pendant 4 h pour permettre leur migration. Les cellules U-87 MG sur la face supérieure ont été enlevées délicatement

avec un coton tige humide et les cellules qui ont migré ont été fixées au formaldéhyde (10 %) pendant 30 minutes et colorées avec 0,1 % de Crystal violet dissous dans 20 % de méthanol pendant 30 minutes. Les filtres ont été rincés à l'eau à plusieurs reprises pour enlever l'excès de Crystal violet. Les cellules U-87 MG qui ont migré à la face inférieure du filtre ont été observées au microscope optique et photographiées (Caméra Retiga 1300 et microscope Nikon modèle TE2000-U) au nombre de quatre champs par puit à un grossissement 40 X puis quantifiées grâce au logiciel Image J software. Les résultats sont représentatifs d'un minimum de trois expériences indépendantes. Les moyennes des cellules qui ont migré sont exprimées avec leurs écarts types respectifs et sont significatifs selon le test t de student ou par analyse de la variance Anova suivie du test Newman Keuls.

#### 2.2.10 Invasion sur Matrigel

Des chambres de Boyden déposées dans des plaques à 24 puits ont été recouvertes de Matrigel (200-300 µg/ml) dilué dans du tampon 0.01 M Tris pH 8.0 et 0.7 % NaCl. Elles ont été incubées 2 h à 37°C, pour permettre au Matrigel de gélifier. Par la suite, 500 µl des suspensions cellulaires U-87 MG des différentes conditions, transfectées avec les ARNi (siCTL et siPIMT) ou les plasmides (pCMV6 vide, pCMV6-PIMT, pCMV6-PIMT (D83V)), d'une concentration de 25 000 cellules/ml, ont été mises dans le puit supérieur. Un volume de 750 µl de milieu avec sérum a été déposé dans le puit inférieur. Après 24 h d'incubation à 37°C, pour permettre la migration des cellules, celles-ci ont été fixées au formaldéhyde (10 %) pendant 2 minutes avant d'être colorées pendant 2 minutes au Crystal violet (0,1 %) dissous dans 20 % de méthanol. Les cellules qui ont migré ont été observées au microscope optique avec un grossissement 100 X et plusieurs champs ont été photographiés (Caméra Retiga 1300 et microscope Nikon modèle TE2000-U). Les cellules U-87 MG, qui ont migré, sont comptées grâce au logiciel Image J software. Les résultats sont représentatifs d'un minimum de trois expériences indépendantes. Les résultats sont significatifs d'après le test t de student ou par analyse de la variance Anova suivie du test Newman Keuls.

### 2.2.11 Zymographie

Pour les cellules transfectées avec les ARNi ou 80 % de confluence pour les diverses lignées stables, les cellules U-87 MG ont étéensemencées dans des plaques à 6 puits. Elles ont subi un changement du milieu sans sérum et elles ont été incubées pendant 24 h à 37°C. Par la suite, 20 µl des milieux conditionnés ont été recueillis et mélangés avec du tampon d'échantillons sans β-mercaptoéthanol puis déposés sur gels de 9 % d'acrylamide contenant de la gélatine (1 %). La migration des protéines a été effectuée à 100 V pendant 30 minutes pour le gel d'entassement et durant 1 h à 130 V pour le gel de séparation. Les gels ont été incubés deux fois pendant 30 minutes dans 50 ml de Triton X-100 (2.5 %) pour renaturer les protéines. Après les avoir lavé à l'eau, les gels ont été incubés pendant 24 h dans du tampon de zymographie gélatine (50 mM de Tris, 0.2 M de NaCl, 5 mM de CaCl<sub>2</sub>, 10 % de Brij 35, à pH 7.6). Les gels ont été colorés avec du bleu de Coomassie (0.4 % de bleu de Coomassie, 40 % de méthanol, 50 % d'H<sub>2</sub>O, 10 % d'acide acétique glaciale) pendant 1 heure puis décolorés (7.5 % d'acide acétique, 30 % de méthanol, 62.5 % d'H<sub>2</sub>O) pendant 1 heure.

### 2.2.12 Analyses statistiques

Après immunodétection des protéines, les films ont été analysés par densitométrie d'images avec un scanner Epson 3490 (Epson Canada Ltée, Toronto, ON, Canada). L'analyse densitométrique a été quantifiée avec le logiciel TotalLab TL 100 v2006 (Nonlinear USA Inc, Durham, NC, États Unis) ou image J Software (NIH) (Bethesda, Maryland, États-Unis). Les données représentent la moyenne ± SD de trois expériences indépendantes ou plus. Les analyses statistiques qui ont permis de voir si les résultats sont significatifs ont été obtenues grâce au test t de student ou par une analyse de la variance Anova suivie du test Newman Keuls intégré dans le logiciel GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, San Diego, CA, États-Unis).



## CHAPITRE III

### RÉSULTATS

#### 3.1 L'ARN interférent dirigé contre la PIMT inhibe son expression

La figure 3.1.A est l'analyse en buvardage de type Western et la figure 3.1.B est l'analyse densitométrique de l'inhibition de la PIMT par ARNi. Les résultats montrent que l'ARNi dirigé contre la PIMT (siPIMT), bloque significativement l'expression de celle-ci à plus de 98 % après 72 h de transfection comparativement aux cellules U-87 MG transfectées avec l'ARNi témoin (siCTL). L' $\alpha$ -tubuline utilisée comme contrôle de la quantité protéique est stable dans les deux conditions, siCTL ou siPIMT.

Ainsi, pour la suite des expériences une inhibition significative quasi complète de l'expression protéique de la PIMT a bien été optimisée.

#### 3.2 La viabilité cellulaire n'est pas affectée par le niveau de PIMT par ARNi

Les cellules U-87 MG ont été utilisées comme modèle cellulaire typique des glioblastomes multiformes. Après 72 h de transfection avec des ARNi dirigé contre la PIMT (siPIMT) ou contrôle (siCTL) (Figure 3.2), les cellules ont subi un test de viabilité MTT. Le test au MTT va agir au niveau des mitochondries de la cellule et la coloration bleue émise a été mesurée par absorbance à 570 nm. Cette coloration bleue représente les cellules métaboliquement actives et vivantes. En effet, le MTT contient un sel, le tétrazolium, qui est réduit en formazan par une enzyme mitochondriale, le succinate déshydrogénase. La figure 3.2 représente l'analyse des absorbances de la viabilité des cellules. Il n'y a aucun changement de la viabilité des cellules U-87 MG transfectées par ARNi dirigé contre la PIMT comparativement à celle des cellules témoins.

Donc, ces résultats montrent bien que la viabilité cellulaire n'est pas affectée par une chute de l'expression de la PIMT.

### 3.3 La diminution de la PIMT par ARNi inhibe la migration des cellules U-87 MG

La migration est une étape cruciale pour les cellules cancéreuses et les glioblastomes multiformes sont les tumeurs les plus agressives et fortement vascularisées parmi les astrocytomes. L'importance de trouver des cibles thérapeutiques est d'autant plus grande que la médiane de survie d'un patient en traitement est de 15 mois et sans traitement de 4,5 mois (Luo *et al.*, 2015). Le principal modèle cellulaire de cette tumeur est la lignée cellulaire d'astrocytomes humains U-87 MG. Actuellement, le rôle fonctionnel de la PIMT dans la migration des cellules cancéreuses est très peu exploré. Visuellement, il peut être constaté une diminution du nombre cellulaire lorsqu'il y a une chute de l'expression de la PIMT par ARNi dans les cellules U-87 MG après 24 h de migration, dans l'essai de cicatrisation (« Wound Healing ») (Figure 3.3 A). De plus, après quantification, l'inhibition de la migration cellulaire est significativement 44 % plus faible dans les cellules transfectées par ARNi dirigé contre la PIMT comparativement aux cellules transfectées avec l'ARNi contrôle (Figure 3.3 B).

Pour appuyer les résultats précédents, un autre essai de migration complémentaire a été fait, les chambres de Boyden. C'est une technique fréquemment employée pour mesurer la capacité migratoire des cellules cancéreuses. La protéine qui a été utilisée pour mimer la matrice extracellulaire est la gélatine qui dérive du collagène, un composant important de celle-ci. Il a été rapporté que la PIMT répare des protéines endommagées de la matrice extracellulaire ce qui favoriserait probablement la migration cellulaire (Lanthier et Desrosiers, 2004). Une baisse d'expression de la PIMT par ARNi dans les cellules U-87 MG diminuait significativement de 40% la migration après 4 h dans les chambres de Boyden recouvertes de gélatine (0,15%) comparativement aux cellules U-87 MG transfectées avec un ARNi contrôle (Figure 3.4 A et B).

Ces résultats avec ces deux essais de migration complémentaires, démontrent que la diminution de l'expression de la PIMT par ARNi réduit fortement la capacité migratoire des cellules U-87 MG. Ces données suggèrent que cette enzyme joue un rôle clé dans les événements moléculaires nécessaires à la migration des glioblastomes U-87 MG.

### 3.4 L'inhibition de la PIMT réduit la capacité des cellules cancéreuses U-87 MG à envahir le Matrigel

Le Matrigel est composé d'un complexe protéique qui se rapproche plus du modèle type de la matrice extracellulaire. La capacité des cellules U-87 MG à envahir le Matrigel a été étudiée par cette technique. Les cellules U-87 MG transfectées par ARNi dirigé contre la PIMT ont migré sur le Matrigel pendant 24 h et les photos montrent une réduction de la migration cellulaire sous cette condition (Figure 3.5 A). La quantification des cellules U-87 MG indique une diminution significative de la migration de 40 % par rapport aux cellules témoins (Figure 3.5 B).

Ces résultats démontrent bien l'importance de l'expression de la PIMT dans la capacité invasive des cellules U-87 MG.

### 3.5 Des lignées stables des formes sauvage et mutée de la PIMT ont été établies dans les cellules U-87 MG

Pour améliorer la compréhension du rôle de la PIMT dans la migration cellulaire de cellules cancéreuses astrocytaires, des lignées stables ont été établies surexprimant la forme sauvage ou mutée et inactive de la PIMT. Les cellules U-87 MG ont été transfectées 48 h avec ces différentes constructions de plasmides surexprimant les différentes formes. Ainsi, la lignée cellulaire qui était utilisée comme témoin exprimait un plasmide vide, donc il y avait seulement la présence de la PIMT endogène (Figure 3.6 A et B). Les lignées pCMV6-

PIMT surexprimaient l'isoforme I de la forme sauvage de la PIMT et d'après l'analyse densitométrique, il y avait une augmentation de 1,5 fois de l'expression protéique de la PIMT comparativement à la PIMT endogène exprimée dans les cellules U-87 MG transfectées avec le plasmide vide (Figure 3.6 A et B). La lignée stable pCMV6-PIMT (D83V) surexprimait une forme mutée et inactive de la PIMT, car au niveau du site catalytique de la PIMT, un acide aspartique en position 83 a été muté par une valine ce qui l'a rendu non fonctionnelle (Cimmino *et al.*, 2008). L'importance de l'acide aspartique chargé négativement réside dans la liaison de l'AdoMet à la PIMT (Kindrachuk *et al.*, 2003). D'après l'analyse densitométrique, la forme mutée et inactive de la PIMT a été surexprimée significativement de 2,3 fois par rapport au contrôle dans les cellules U-87 MG (Figure 3.6 A et B).

### 3.6 La viabilité cellulaire n'est pas affectée par la surexpression de la PIMT

La viabilité cellulaire au MTT a également été testée sur les lignées stables, lors de la surexpression de la forme sauvage (PIMT) et mutée de la PIMT (PIMT (D83V)) dans les cellules U-87 MG. L'analyse des résultats dans les différentes conditions montre que la viabilité était similaire, que cela soit pour la surexpression de la forme sauvage ou mutée et inactive de la PIMT dans les cellules U-87 MG (Figure 3.7).

Donc, ces résultats montrent bien que la viabilité cellulaire n'est pas affectée par la surexpression de la forme sauvage ou de la forme mutée et inactive de la PIMT dans les cellules U-87 MG.

### 3.7 La surexpression de la forme sauvage de la PIMT dans les lignées stables augmente la migration des cellules U-87 MG

Comme précédemment, le même essai de migration (« Wound Healing ») a aussi été fait pour voir l'effet de la surexpression de la forme sauvage et de son activité catalytique.

Visuellement, il a été observé une augmentation du nombre cellulaire lors de la surexpression de la forme sauvage de la PIMT après 24 h de migration (Figure 3.8 A). La quantification montre une induction significative de 35 % comparativement aux cellules contrôles transfectées avec le plasmide vide pCMV6 (Figure 3.8 B).

Le deuxième essai de migration, les chambres de Boyden, est venu appuyer les résultats du premier essai de migration. Les lignées stables de cellules U-87 MG qui exprimaient différentes formes de la PIMT ont migré à travers les chambres de Boyden recouvertes de gélatine (0,15 %) pendant 4 h. L'observation visuelle montre une migration cellulaire plus prononcée lors de la surexpression de la PIMT sauvage (Figure 3.9 A). L'analyse quantitative a montré que la forme active de la PIMT (pCMV6-PIMT) augmentait significativement de 85 % la migration cellulaire (Figure 3.9 B).

Par contre, l'absence de l'activité catalytique de l'enzyme dans les cellules U-87 MG (PIMT (D83V)) n'affectait pas la migration des cellules U-87 MG dans les deux essais puisqu'elle restait au niveau basal comparativement au contrôle (Figure 3.8 A et B et Figure 3.9 A et B).

La surexpression de la forme sauvage de la PIMT dans les cellules U-87 MG indique clairement une augmentation significative de la migration cellulaire contrairement aux cellules U-87 MG transfectées avec la forme mutée et inactive de la PIMT. Ces résultats complémentaires avec deux essais de migration soulignent l'importance de l'activité catalytique de la PIMT dans le processus de migration cellulaire des U-87 MG.

### 3.8 La surexpression de la forme sauvage de la PIMT dans les lignées stables augmente l'invasion des cellules U-87 MG dans le Matrigel

Les lignées stables de cellules U-87 MG qui exprimaient différentes formes de PIMT ont migré à travers les chambres de Boyden recouvertes de Matrigel (200-300 µg/ml) pendant 24 h. Visuellement, il y avait plus de cellules lorsque la PIMT sauvage était surexprimée dans les cellules U-87 MG comparativement au contrôle. Au contraire, les

cellules U-87 MG, qui surexprimaient la forme mutée et inactive de la PIMT, avaient un nombre de cellules semblable au contrôle (Figure 3.10 A). De plus, la quantification des cellules indiquait que les cellules U-87 MG exprimant la forme active de la PIMT (pCMV6-PIMT) induisaient doublement l'invasion et de façon significative (Figure 3.10 B). Inversement, la lignée stable qui exprimait la forme mutée et inactive de la PIMT (pCMV6-PIMT (D83V)), diminuait très légèrement l'invasion mais les résultats n'étaient pas significatifs comparés au contrôle (Figure 3.10 B).

En plus de l'importance du niveau d'expression de la PIMT, ces résultats affirment que l'activité catalytique de la PIMT est impliquée dans l'invasion des cellules cancéreuses U-87 MG. Conséquemment, ces résultats suggèrent que cette enzyme est essentielle pour l'invasion qui est un processus clé permettant aux cellules cancéreuses d'envahir d'autres organes et de former de nouveaux foyers, les métastases.

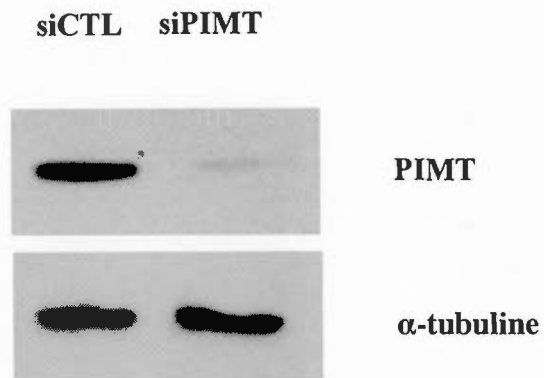
### 3.9 L'inhibition et la surexpression de la PIMT n'affecte pas l'activation de pro-MMP-2

D'après les résultats obtenus, la PIMT est impliquée dans la migration et l'invasion mais le mécanisme d'action est inconnu à ce stade. Par contre, d'autres enzymes sont beaucoup mises en avant dans le cancer telles que les métalloprotéases (MMPs). Il existe différents classes de MMPs dont les gélatinases MMP-2 et MMP-9 (Cathcart *et al.*, 2015). Les MMPs sont connues pour influencer l'environnement des cancers en favorisant l'angiogenèse, le développement de la tumeur et les métastases (Kalluri et Zeisberg, 2006). Les MMP-2 et MMP-9 sont des gélatinases qui dégradent la matrice extracellulaire pour permettre l'invasion des cellules cancéreuses. Ainsi, des expériences complémentaires ont été faites pour analyser si le niveau de PIMT dans les cellules agit sur les métalloprotéases MMP-2 et MMP-9 pour favoriser la migration. Pour cela, les milieux conditionnés ont été récoltés, ceux des cellules U-87 MG transfectées avec les ARNi dirigés contre la PIMT et non spécifique ou ceux de lignées stables transfectées avec les plasmides (pCMV6 vide, pCMV6-PIMT, pCMV6-PIMT (D83V)). Les divers milieux conditionnés ont été analysés

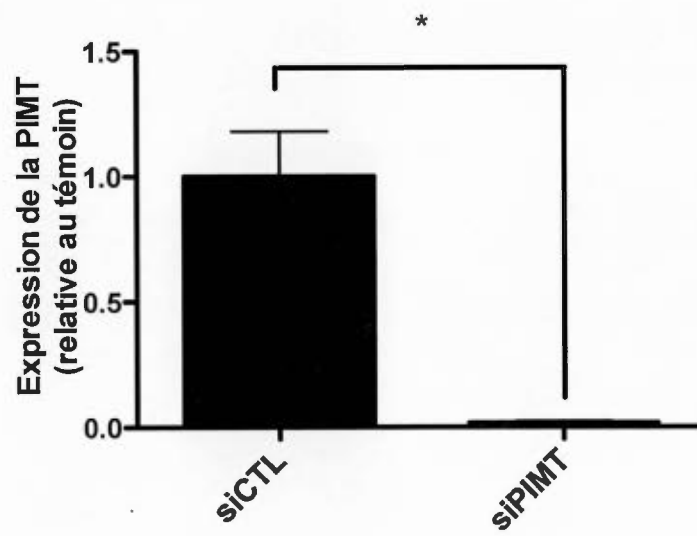
par zymographie (Figure 3.11 B et D). Dans les milieux des cellules U-87 MG, les MMP-9 sont très peu ou pas observées ainsi seule les pro-MMP-2 ont été détectées. Le témoin positif montre deux bandes, celle de pro-MMP-2 et de sa forme clivée MMP-2 (Figure 3.11 B et D). Les cellules U-87 MG transfectées avec un ARNi dirigé contre la PIMT ou un ARNi contrôle montrent seulement la forme pro-MMP-2 (Figure 3.11 B). Les résultats ont la même allure pour les lignées stables, que cela soit pour les formes sauvage (PIMT) ou mutée et inactive de la PIMT (PIMT (D83V)) comparativement à leur contrôle (Figure 3.11 D).

Donc, ces résultats montrent que la PIMT n'a aucun effet sur l'activation de pro-MMP-2 et n'agit pas sur sa sécrétion extracellulaire. Mais ces résultats ont permis d'éliminer un mécanisme d'action dans la migration des cellules cancéreuses ouvrant des nouvelles hypothèses sur le rôle de la PIMT dans le développement tumorale.

(A)

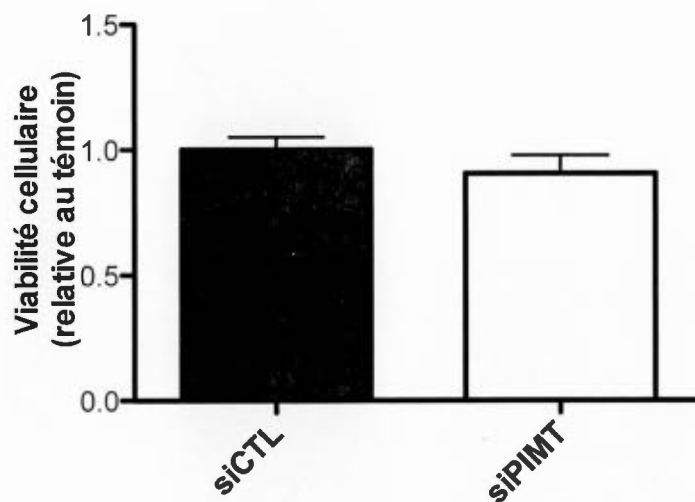


(B)

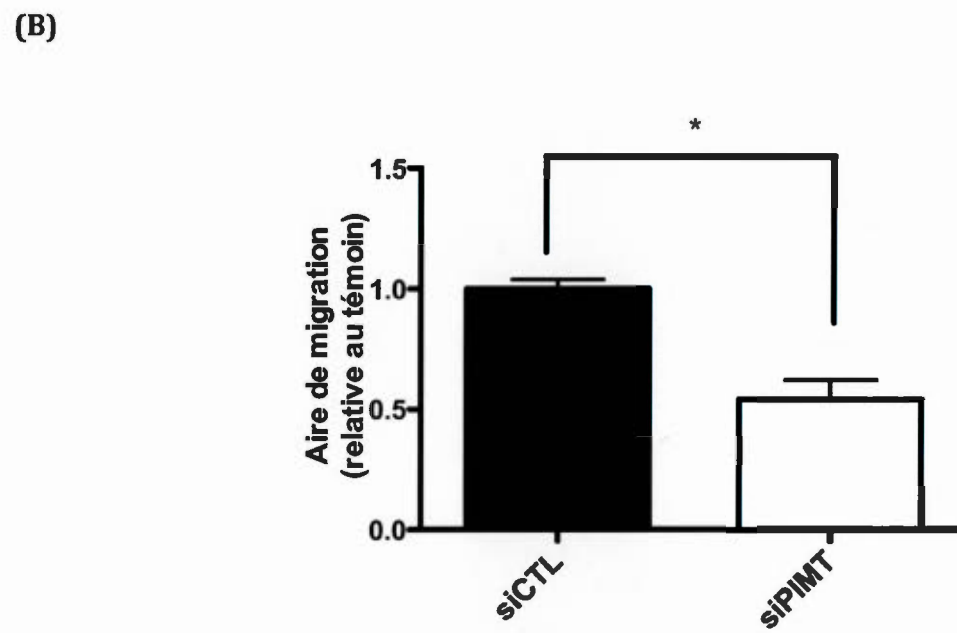
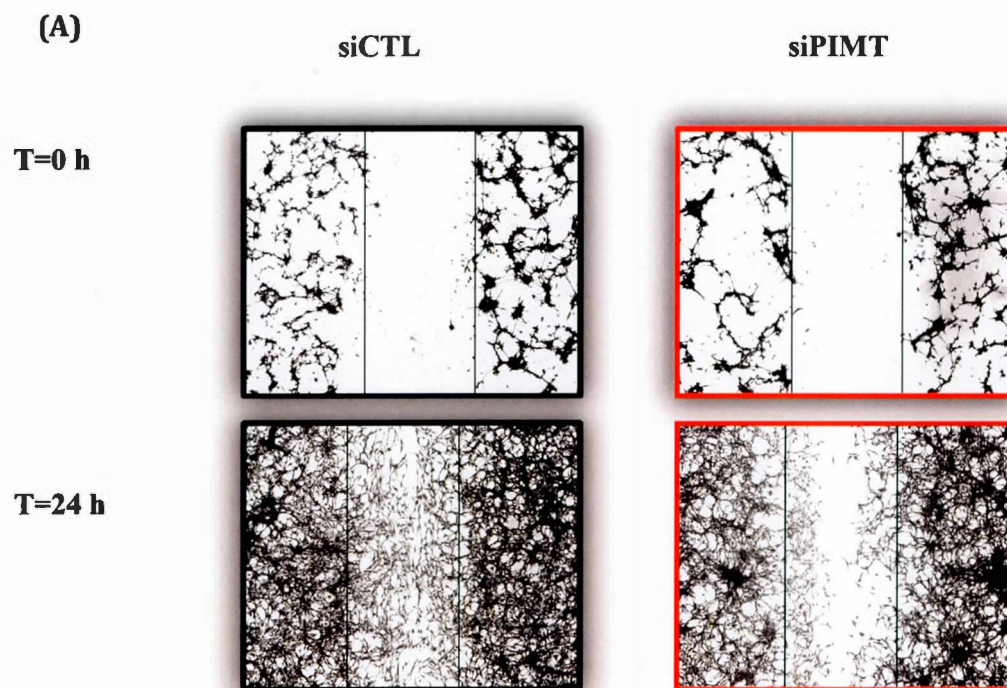




**Figure 3.1 Efficacité de l'inhibition de la PIMT par ARN interférent.** (A) Les cellules U-87 MG ont été transfectées avec 40 nM d'un ARNi dirigé contre la PIMT (siPIMT) ou un ARNi non spécifique qui sert de témoin (siCTL) durant 72 h. Les protéines des lysats cellulaires ont été analysées par buvardage de type Western et immunodétectées avec des anticorps spécifiques à la PIMT et l' $\alpha$ -tubuline. (B) Les expressions de la PIMT ont été mesurées par analyse densitométrique et elles sont représentatives de trois expériences indépendantes. Le symbole (\*) montre une différence significative ( $p < 0,05$ ) entre les cellules traitées et contrôles d'après le test t de student.



**Figure 3. 2 L'inhibition de la PIMT par ARNi n'affecte pas la viabilité des cellules U-87 MG.** Les histogrammes représentent la viabilité cellulaire par le test MTT des cellules U-87 MG transfectées. Après avoir transfecté les cellules U-87 MG avec les ARNi, les cellules ont été mises dans des plaques à 96 puits à une densité de 5000 cellules par puit et du milieu contenant 10 % de sérum bovin et 1 mM de pyruvate de sodium pendant 72 h à 37°C. Ensuite, les cellules ont été incubées avec 10 µl de MTT (5 mg/ml) durant 4 h à 37°C. Puis, un volume de 100 µl de SDS-HCl (0,01 M) a été ajouté aux cellules durant 4 h à 37°C avant la lecture à 570 nm. Les résultats représentent la moyenne de trois expériences.



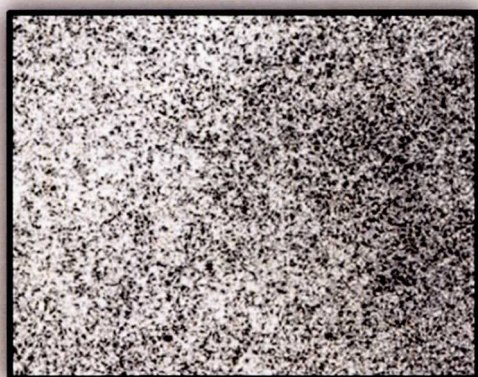
**Figure 3.3 L'inhibition de la PIMT par ARNi réduit la migration des cellules U-87 MG lors de l'essai du « Wound Healing ».** (A) Les cellules U-87 MG ont été mises au nombre de 100 000 cellules dans des plaques à 6 puits et transfectées pendant 72 h avec un ARNi dirigé contre la PIMT ou un ARNi non spécifique utilisé comme témoin (siCTL). Après transfection, un trait avec un embout stérile P200 a été fait sur la couche monocellulaire des cellules U-87 MG. Les cellules ont été fixées et lavées avec du milieu de culture et du PBS, fixées avec du formaldéhyde (10 %) puis colorées au Crystal violet (0,1 %) dissous dans 20 % de méthanol avant d'être observées au microscope optique (40 X) et photographiées (caméra Retiga 1300 et microscope Nikon modèle TE2000-U) (T=0 h). D'autre part, les cellules qui ont été incubées pendant 24 h à 37°C, pour observer la migration, ont subi les mêmes traitements qu'à T=0 h (T=24 h). (B) L'analyse quantitative représente l'aire de migration des cellules U-87 MG. Elle est représentative de quatre expériences indépendantes. Le symbole (\*) montre une différence significative ( $p < 0,05$ ) entre les cellules traitées et contrôles d'après le test t de student.

(A)

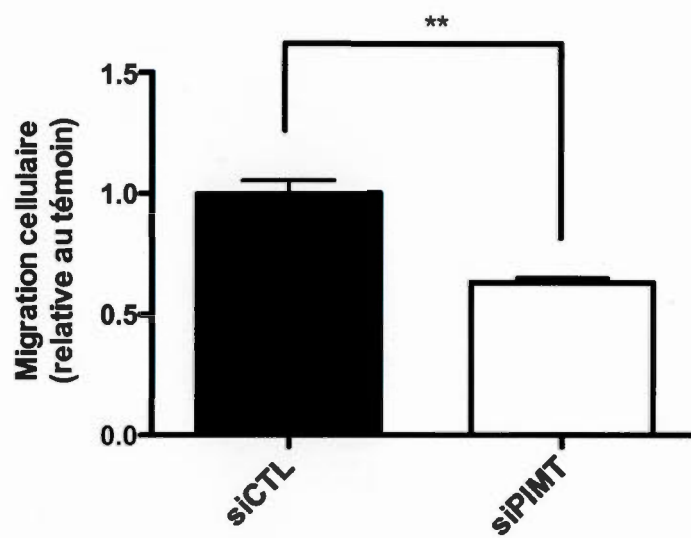
T=4 h

siCTL

siPIMT

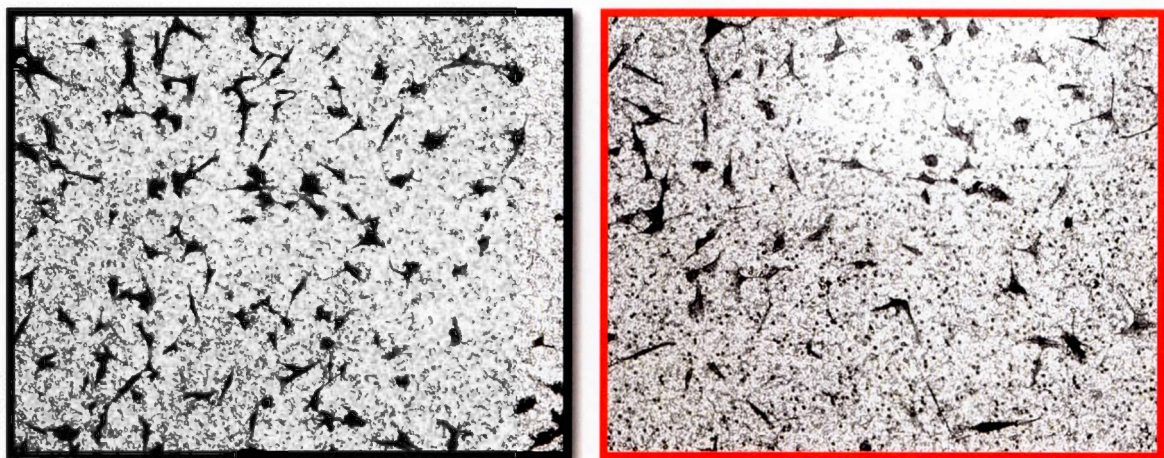


(B)

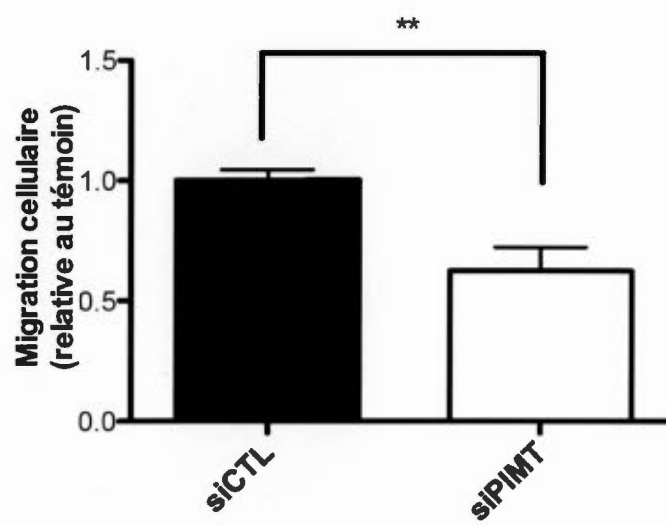


**Figure 3.4 L'inhibition de l'expression de la PIMT par ARNi réduit la migration des cellules U-87 MG lors de l'essai dans les chambres de Boyden.** (A) Les cellules U-87 MG ont été transfectées par ARNi dirigé contre la PIMT (siPIMT) ou un ARNi non spécifique qui sert de témoin (siCTL) durant 72 h. 50 000 cellules ont été mises dans le puit supérieur de la chambre de Boyden recouverte de gélatine (0,15 %). Après 4 h d'incubation à 37°C, les cellules U-87 MG qui ont migré se retrouvent sur la face inférieure de la chambre de Boyden. Pour les visualiser, elles ont été fixées au formaldéhyde (10 %) et colorées au Crystal violet (0,1 %) dissous dans 20 % de méthanol. Par la suite, elles ont été observées au microscope optique (40 X) et photographiées (caméra Retiga 1300 et microscope Nikon modèle TE2000-U). (B) Le nombre de cellules qui ont migré a été quantifié par image J Software. Les données sont représentatives de trois expériences indépendantes. Les symboles (\*\*) montrent une différence significative ( $p < 0,01$ ) entre les cellules traitées et contrôles d'après le test t de student.

(A)



(B)

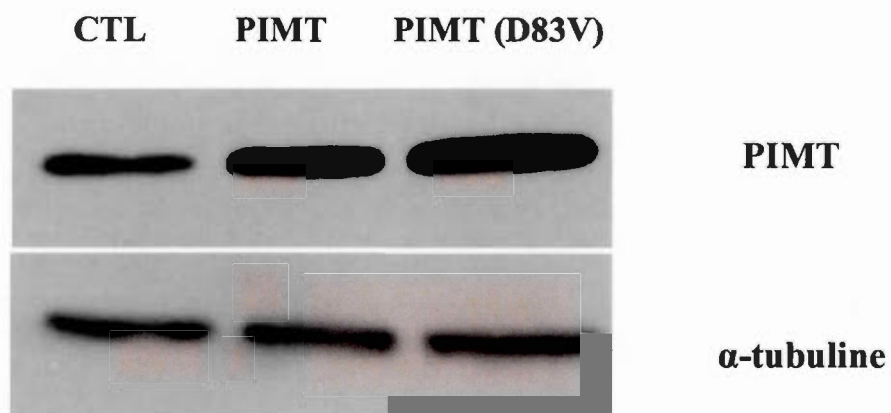




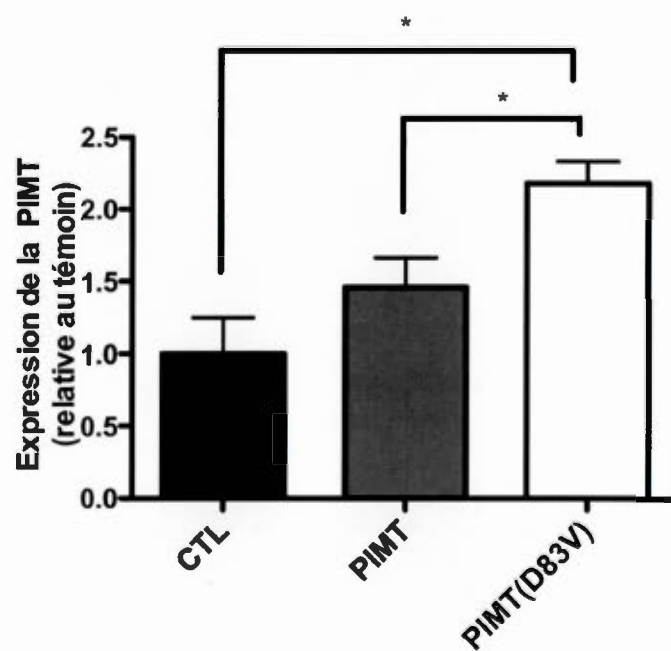
**Figure 3.5 L'inhibition de l'expression de la PIMT par ARNi réduit l'invasion des cellules U-87 MG sur Matrigel.** (A) Après transfection des cellules U-87 MG avec les ARN interférents dirigés contre la PIMT ou contrôle, 25 000 cellules ont migré 24 h dans des chambres de Boyden avec filtres recouverts de Matrigel (200-300  $\mu\text{g/ml}$ ) à 37°C. Les cellules ont été fixées au formaldéhyde (10 %), colorées au Crystal violet (0,1 %) dissous dans 20 % de méthanol puis elles ont été observées, à un grossissement 100 X, et photographiées (caméra Retiga 1300 et microscope Nikon modèle TE2000-U). (B) Le nombre de cellules qui ont migré a été quantifié par image J Software. Les données sont représentatives de quatre expériences indépendantes. Le symbole (\*\*) représente une différence significative ( $p < 0,01$ ) entre les cellules traitées et témoins selon le test t de student.



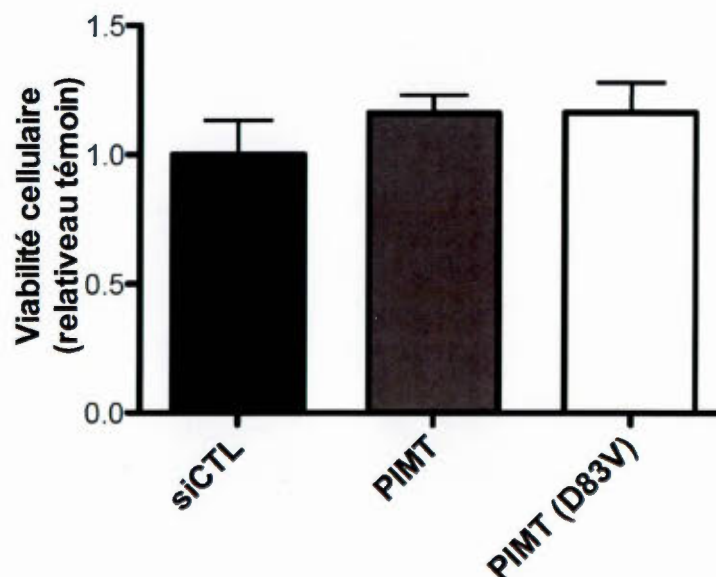
(A)



(B)



**Figure 3.6 Niveau de surexpression des formes sauvage et mutée de la PIMT.** (A) Les cellules U-87 MG ont été transfectées avec 1  $\mu$ g de différents plasmides pCMV6 contenant différentes constructions dont le plasmide pCMV6 vide qui sert de témoin (CTL), le plasmide exprimant la forme sauvage pCMV6-PIMT (PIMT) ou mutée et inactive pCMV6-PIMT (D83V) (PIMT (D83V)), due à une mutation en position 83 de l'acide aspartique (D) par la valine (V). La transfection a été faite en présence de la Turbofectine 8.0 durant 48 h, à 37°C. Les niveaux d'expression de la PIMT ainsi que celui de l' $\alpha$ -tubuline ont été analysés par buvardage de type Western. (B) L'analyse densitométrique représente trois expériences indépendantes. Le symbole (\*) représente les différences significatives ( $p < 0,05$ ) entre les deux conditions d'après l'analyse de la variance One-way ANOVA suivie du test Newman Keuls.



**Figure 3.7 La surexpression de la forme sauvage ou mutée de la PIMT n'affecte pas la viabilité des cellules U-87 MG.** Les histogrammes représentent la viabilité cellulaire par le test MTT des cellules U-87 MG transfectées. Après avoir transfecté les cellules U-87 MG avec les plasmides, pCMV6 vide, pCMV6-PIMT, pCMV6-PIMT (D83V), les cellules ont été mises dans des plaques à 96 puits à une densité de 5000 cellules par puit et du milieu contenant 10 % de sérum bovin et 1 mM de pyruvate de sodium pendant 5 jours. Les cellules ont été incubées avec 10  $\mu$ l de MTT (5 mg/ml) durant 4 h à 37°C. Ensuite, un volume de 100  $\mu$ l de SDS-HCl (0,01 M) a été ajouté aux cellules puis elles ont été incubées durant 4 h à 37°C avant la lecture à 570 nm. Les résultats représentent la moyenne de trois expériences.

(A)

CTL

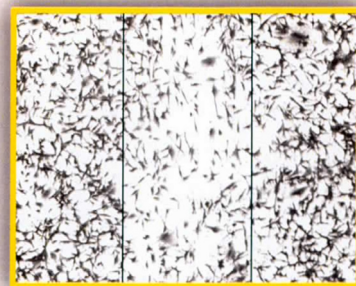
PIMT

PIMT (D83V)

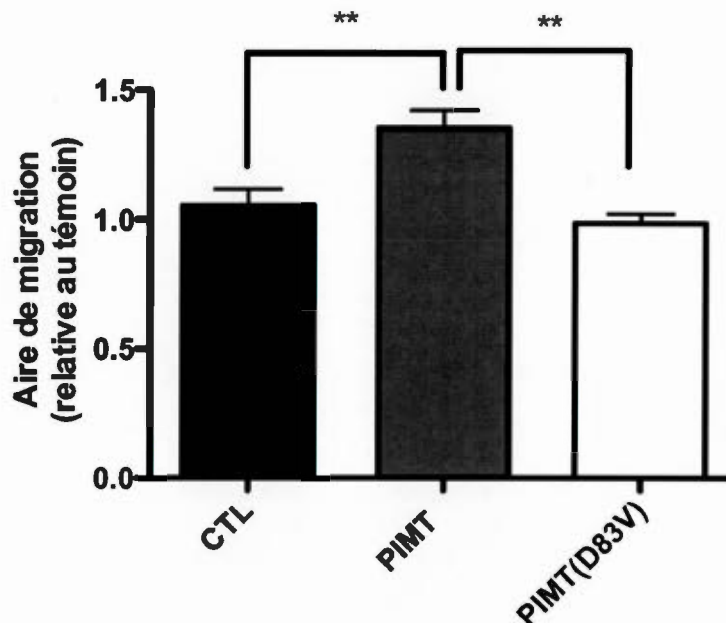
T=0 h



T=24 h



(B)



**Figure 3. 8 La surexpression de la PIMT sauvage augmente la migration des cellules U-87 MG dans l'essai du « Wound Healing ».** (A) Les lignées stables de cellules U-87 MG transfectées avec différents plasmides, dont pCMV6 vide qui sert de témoin (CTL), le plasmide surexprimant la forme sauvage pCMV6-PIMT (PIMT) ou mutée et inactive (PIMT (D83V)), ont été mises au nombre de 100 000 cellules dans des puits d'une plaque à 6 puits. Lorsque les cellules ont atteint 80 % de confluence, un trait avec un embout stérile P200 a été fait sur la couche monocellulaire des cellules U-87 MG transfectées. Les cellules ont été lavées avec du milieu de culture et du PBS, les cellules ont été fixées avec du formaldéhyde 10 % puis colorées au Crystal violet (0,1 %) dissous dans 20 % de méthanol avant d'être observées au microscope optique (40 X) et photographiées (caméra Retiga 1300 et microscope Nikon modèle TE2000-U) (T=0 h). D'autres cellules qui ont été incubées 24 h à 37°C, pour observer la migration, ont subi les mêmes traitements qu'à T=0 h (T=24 h). (B) L'analyse quantitative représente l'aire de migration des cellules U-87 MG. Elle est représentative de six expériences indépendantes. Les symboles (\*\*) représentent les différences significatives ( $p < 0,01$ ) analysées selon la variance One-way ANOVA suivie du test Newman Keuls.



(A)

T=4 h

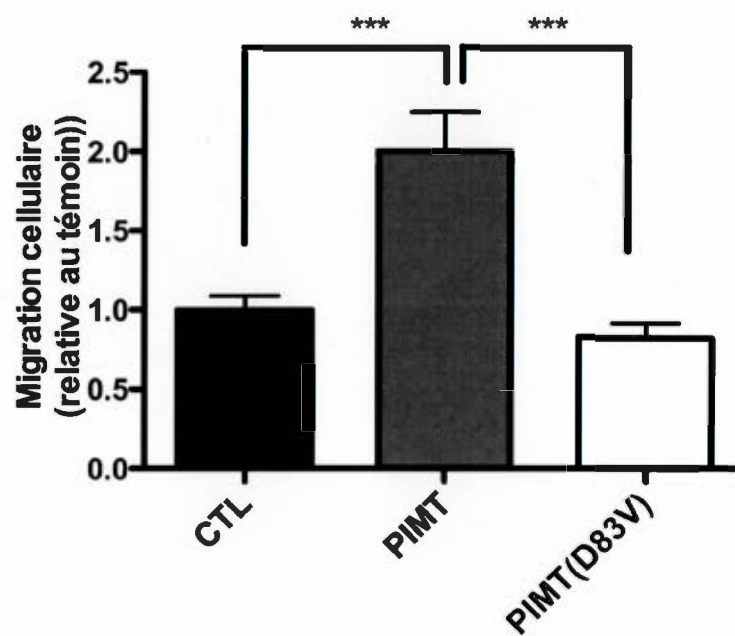
CTL

PIMT

PIMT (D83V)



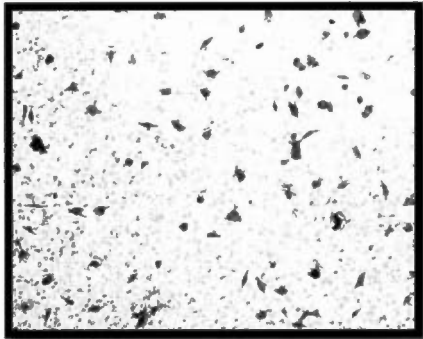
(B)



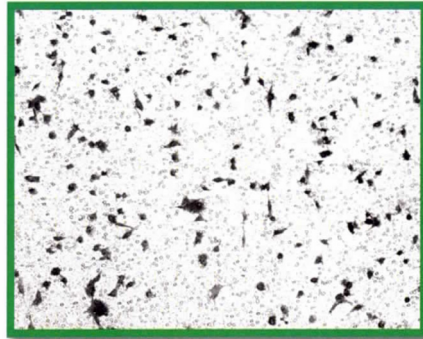
**Figure 3.9 La surexpression de la PIMT sauvage augmente la migration des cellules U-87 MG lors des essais dans les chambres de Boyden.** (A) Les lignées stables de cellules U-87 MG ont été transfectées avec différents plasmides dont pCMV6 vide qui sert de témoin (CTL), le plasmide surexprimant la forme sauvage pCMV6-PIMT (PIMT) ou mutée et inactive (PIMT (D83V)). Puis, 50 000 cellules ont été mises dans le puit supérieur de la chambre de Boyden avec filtre recouvert de gélatine 0,15 %. Après 4 h d'incubation à 37°C, les cellules U-87 MG qui ont migré se retrouvent sur la face inférieure de la chambre de Boyden. Pour les visualiser, elles ont été fixées au formaldéhyde (10 %) et colorés au Crystal violet (0,1 %) dissous dans 20 % de méthanol. Par la suite, elles ont été observées au microscope optique (40 X) et photographiées (caméra Retiga 1300 et microscope Nikon modèle TE2000-U). (B) Le nombre de cellules qui ont migré a été quantifié par image J Software. Les données sont représentatives de huit expériences indépendantes. Les symboles (\*\*\*) représentent les différences significatives ( $p < 0,001$ ) entre les niveaux de migration dans les différentes conditions analysées selon la variance One-way ANOVA suivie du test Newman Keuls.

(A)

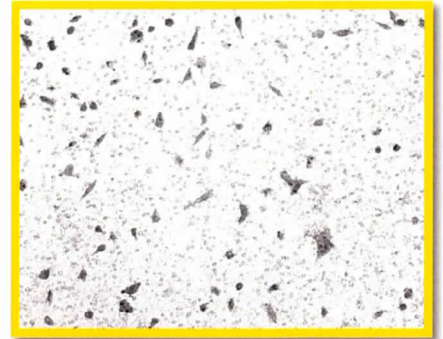
CTL



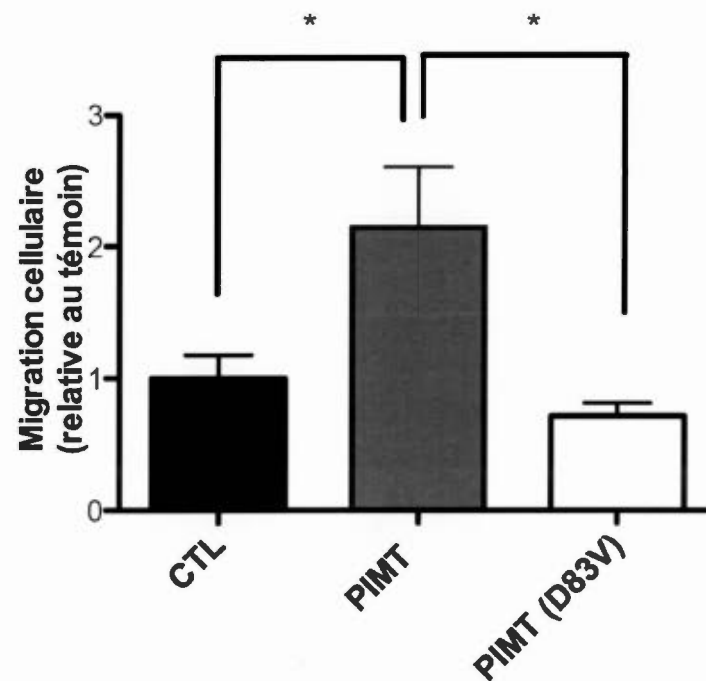
PIMT



PIMT (D83V)



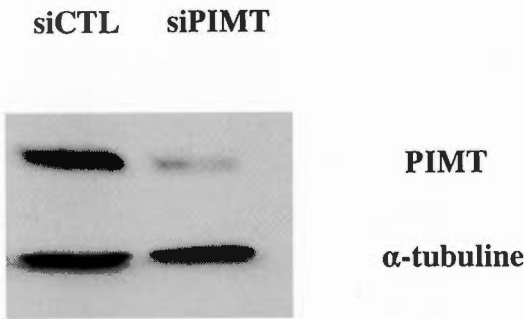
(B)



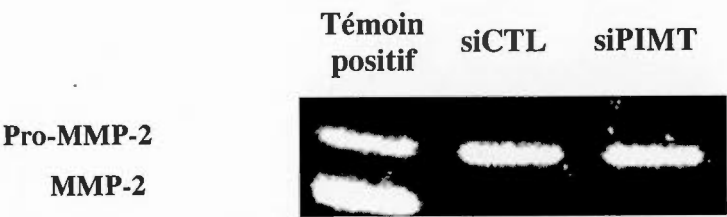


**Figure 3. 10 La surexpression de la PIMT sauvage induit l'invasion des cellules U-87 MG dans le Matrigel.** (A) Les lignées stables de cellules U-87 MG ont été transfectées avec différents plasmides dont pCMV6 vide qui sert de témoin (CTL), le plasmide surexprimant la forme sauvage pCMV6-PIMT (PIMT) ou mutée et inactive (PIMT (D83V)). Un nombre de 25 000 cellules a été mis dans le puit supérieur de la chambre de Boyden recouverte de Matrigel (200-300 µg/ml). Après 24 h d'incubation à 37°C, les cellules U-87 MG qui ont migré se retrouvaient sur la face inférieure de la chambre de Boyden. Pour les visualiser, elles ont été fixées au formaldéhyde (10 %) et colorées au Crystal violet (0,1 %) dissous dans 20 % de méthanol. Puis, elles ont été observées au microscope optique, à un grossissement 100 X, et photographiées (caméra Retiga 1300 et microscope Nikon modèle TE2000-U). (B) Les cellules qui ont migré ont été quantifiées par image J Software. Les données sont représentatives de quatre expériences indépendantes. Le symbole (\*) sont les différences significatives ( $p < 0,05$ ) entre les différentes conditions examinées d'après l'analyse de la variance One-way ANOVA suivie du test Newman Keuls.

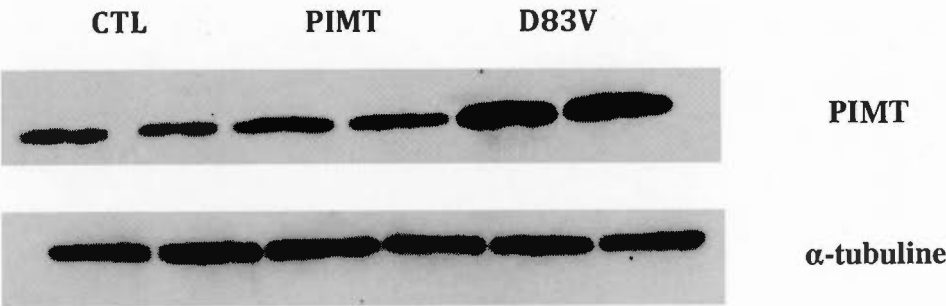
(A)



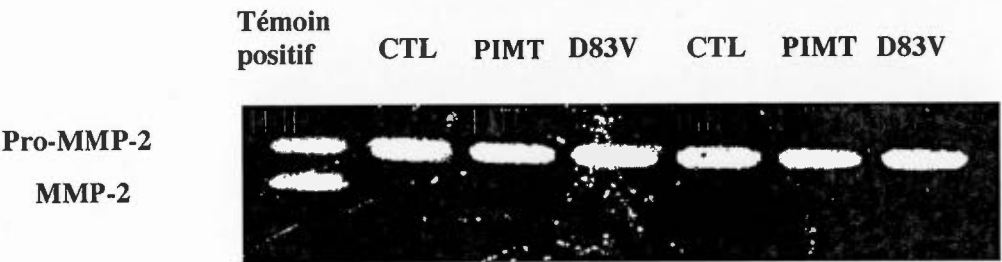
(B)



(C)



(D)



**Figure 3.11 La PIMT n'affecte pas l'activation de la pro-MMP-2.** (A et B) Les cellules U-87 MG ont été transfectées avec un ARNi dirigé contre la PIMT ou un ARNi non spécifique (siCTL). (C et D) Alternativement, les lignées stables ont été transfectées avec le plasmide contrôle (pCMV6 vide), le plasmide de la forme sauvage de la PIMT (pCMV6-PIMT) et le plasmide de la forme mutée et inactive (pCMV6-PIMT (D83V)). (B et D) Les milieux conditionnés de ces différentes conditions expérimentales ont été déposés sur gels d'acrylamide 9 % contenant 1 % de gélatine pour les analyser par zymographie. Le témoin positif représente la forme de pro-MMP-2 activée en MMP-2 à la suite d'un traitement des cellules avec la lectine concavoline A. (A et C) Quant aux lysats cellulaires des différentes conditions expérimentales ont été analysés par SDS-PAGE suivi d'une immunodétection de type Western pour détecter la PIMT et l' $\alpha$ -tubuline. Il est à noter que l'ordre du dépôt des échantillons provenant des lignées stables est différent pour l'immunobuvardage (C) et la zymographie (D). Les résultats représentent trois expériences indépendantes. L'analyse des données a été faite avec le logiciel Image J Software.

## DISCUSSION

La protéine PIMT est une enzyme qui catalyse une réaction de méthylation et qui a comme fonction connue de réparer spécifiquement les résidus L-isoaspartates sur des peptides et protéines incluant le collagène de type I vieilli, la tubuline et l'actine (Desrosiers et Fanelus, 2011; Lanthier et Desrosiers, 2004). D'autre part, une étude récente a démontré un nouveau rôle de la PIMT, celui de régulateur de la stabilité de la p53, connue comme suppresseur de tumeurs (Lee *et al.*, 2012).

Au cours du vieillissement, les résidus L-isoaspartates s'accumulent et deviennent néfastes pour la cellule. Parmi tous les tissus examinés, la PIMT est la plus abondante dans le cerveau ce qui a permis d'établir une relation avec des maladies neurodégénératives telles que le Parkinson, l'Alzheimer, l'épilepsie (Desrosiers et Fanelus, 2011; Ouazia *et al.*, 2014; Yamamoto *et al.*, 1998) et le cancer (Khalil, 2007). Cependant, le rôle de la PIMT dans le cancer reste toujours très peu exploré. Le cancer vient d'une prolifération cellulaire anarchique dans un tissu sain. Les cellules cancéreuses ont besoin de migrer pour se développer mais aussi d'un apport nutritif et d'oxygène par le processus de l'angiogenèse.

Les tumeurs cérébrales sont en majorité des glioblastomes multiformes (GBMs) classées d'après l'OMS tumeur de grade IV. Elles sont les tumeurs les plus agressives et fortement vascularisées parmi les astrocytomes. La survie d'un patient est très courte puisque après un diagnostic d'un astrocytome de grade IV, on compte une espérance de vie entre 4,5 et 15 mois selon le traitement (Kleihues *et al.*, 1995; Luo *et al.*, 2015). Les GBMs sont très infiltrantes notamment au niveau du parenchyme cérébrale avec des régions très hypoxiques et beaucoup de nécroses (Louis *et al.*, 2007). Parfois, la résection du glioblastome, lors d'une intervention chirurgicale, n'est pas suffisante. D'autre part, la chirurgie est une intervention envahissante souvent avec des effets secondaires puisque le cerveau est un organe qui contrôle nos sens et le siège de la réflexion par exemple. De plus, la barrière hémato-encéphalique filtre toutes les substances médicamenteuses ce qui ajoute

un problème supplémentaire lors des traitements comme la chimiothérapie qui devient moins efficace. D'où l'importance de développer de nouvelles cibles thérapeutiques par des recherches innovantes.

#### 4.1 L'implication de la PIMT dans la migration cellulaire

Les glioblastomes U-87 MG sont un des principaux modèles cellulaires des glioblastomes multiformes. Ainsi nous les avons analysés pour voir le rôle de la PIMT dans la migration des cellules cancéreuses. En premier lieu, nous avons inhibé l'expression de la PIMT et le traitement avec l'ARNi dirigé contre la PIMT pendant 72 h a bloqué efficacement l'expression de la PIMT à plus de 98 % comparativement aux cellules U-87 MG transfectées avec l'ARNi contrôle (Figure 3.1). Des lignées stables ont aussi été établies pour surexprimer la PIMT par transfection avec les différents plasmides, (pCMV6 vide, pCMV6-PIMT et pCMV6-PIMT (D83V)). La forme sauvage (PIMT) a été surexprimée 1,5 fois et la forme mutée et inactive (PIMT (D83V)) a été surexprimée significativement de 2,3 fois par rapport aux cellules U-87 MG contrôles (Figure 3.6 B). La forme sauvage de la PIMT dans les cellules U-87 MG a été très faiblement surexprimée mais peut être mieux exprimée à l'avenir en améliorant les conditions. Par exemple, en sélectionnant une meilleure lignée ou encore en linéarisant le plasmide avec des enzymes de restriction. La viabilité des cellules par le test MTT a été évaluée et les résultats ont montré que celle-ci n'était ni affectée par une chute de l'expression de la PIMT (ARNi) ni par la surexpression de la forme sauvage humaine de la PIMT (PIMT) ainsi que la forme mutée et inactive (PIMT (D83V)) (Figure 3.2 et 3.7). Donc, les cellules étaient métaboliquement actives et vivantes lors des expériences. Cependant, lors d'une chute de l'expression de la PIMT par ARNi dans les cellules U-87 MG, nous avons constaté une diminution significative de 44 % de la migration cellulaire après 24 h dans l'essai de cicatrisation (« Wound Healing ») (Figure 3.3). La migration des cellules U-87 MG dans les chambres de Boyden recouvertes de gélatine après 4 h a appuyé les résultats précédents puisqu'il y avait aussi une réduction significative de 40 % de la migration lors d'une chute

de l'expression de la PIMT comparativement aux cellules U-87 MG transfectées avec l'ARNi contrôle (Figure 3.4). Par contre, les cellules U-87 MG transfectées avec le plasmide pCMV6-PIMT surexprimant la forme sauvage de la PIMT induisaient significativement de 35 % la migration dans l'essai de cicatrisation (« Wound Healing ») (Figure 3.8) et beaucoup plus dans les chambres de Boyden recouvertes de gélatine puisqu'il y avait une induction significative de 85 % de la migration comparativement aux cellules contrôles transfectées avec le plasmide pCMV6 vide (Figure 3.9). En plus de l'expression, cela était bien due à l'activité catalytique de la PIMT puisque les cellules U-87 MG transfectées cette fois-ci avec le plasmide pCMV6-PIMT(D83V) surexpriment la forme mutée et inactive de la PIMT, la migration restait au niveau basal (Figure 3.8 et 3.9). L'importance de l'acide aspartique en position 83, qui a été muté en une valine (Cimmino *et al.*, 2008), est que celui-ci participe à la liaison de l'AdoMet à la PIMT nécessaire pour son action catalytique (Kindrachuk *et al.*, 2003). Donc, nous avons démontré que l'expression ainsi que l'activité catalytique de la PIMT favorisent la migration des cellules U-87 MG. Ces résultats soulignent l'importance de l'enzyme PIMT dans les événements moléculaires qui permettent la migration des glioblastomes U-87 MG.

D'ailleurs, l'équipe de Cho a inhibé l'expression de la PIMT par ARNi dans les cellules cancéreuses du sein MDA-MB-231 et après 24 h de migration dans l'essai de cicatrisation « Wound Healing », elle a observé une diminution de la migration cellulaire. Il est connu que les cellules cancéreuses perdent leur polarité cellulaire lors de la migration. D'autant plus que la E-cadhérine, molécule d'adhérence qui permet la jonction cellulaire dans les cellules épithéliales (Hatta et Takeichi, 1986), augmentait lorsque le niveau de PIMT diminuait d'où le phénomène de transition épithélial mésenchymateux (EMT) c'est-à-dire que les cellules passent de l'état épithélial à mésenchymateux. D'ailleurs, la diminution de l'expression de la E-cadhérine est accompagnée d'une hausse de la N-cadhérine dans les cellules cancéreuses d'origine épithéliale (Hazan *et al.*, 2004).

Au contraire, dans les glioblastomes, il n'y a pas de E-cadhérines mais les N-cadhérines sont dérégulées. En effet, on observe une diminution de N-cadhérines dans les glioblastomes de haut grade (III et IV) comparativement au cerveau sain. D'autre part, la

technique du « Wound Healing » a été utilisée et les cellules gliales tumorales migraient dans tous les sens donc il y avait une perte de la polarité cellulaire. De plus, les fibres d'actine et les microtubules avaient une réorganisation de leurs réseaux de fibres (Camand *et al.*, 2012).

D'autant plus que les glioblastomes présentent plusieurs similitudes avec les cellules épithéliales qui possèdent un caractère EMT. En effet, on retrouve différents marqueurs de surfaces CD29, CD44, CD90, CD105 mais aussi l'expression des gènes tels qu'YKL-40, tenascin, osteonectin et CD105 (Tso *et al.*, 2006). De plus, le facteur de transcription Twist1 est surexprimé dans les GBMs (Mikheeva *et al.*, 2010). D'ailleurs, dans les cellules cancéreuses du sein MDA-MB-231, la PIMT pourrait activer indirectement la transition EMT en surexprimant les facteurs de transcription Snail et Slug (Ryu *et al.*, 2011). Ainsi, il faudrait voir comment la PIMT régule ces différents activateurs de la transition EMT et dans d'autres types de cancer puisque la PIMT est présente dans tous les tissus de mammifères. Mais encore plus dans les GBMs qui seront une nouvelle approche notamment avec la lignée cellulaire de glioblastome U-87 MG et aussi avec d'autres lignées cellulaires de glioblastomes pour généraliser la tendance dans ces cellules. Il y a 4 grades de glioblastomes (OMS), il serait intéressant de voir la tendance de migration dans les autres grades, d'autant plus que le grade III est invasif (Louis *et al.*, 2007).

#### 4.2 L'implication de la PIMT dans l'invasion

Des études précédentes dans notre laboratoire ont permis de voir une augmentation du niveau de PIMT sur plusieurs lignées cellulaires dont les cellules U-87 MG lorsqu'elles étaient détachées de la matrice extracellulaire (Lanthier et Desrosiers, 2006). Une autre étude a appuyé ces résultats, puisqu'il a été observé la même tendance dans les cellules cancéreuses du sein MBA-MD-231 (Ryu *et al.*, 2011). En plus, la PIMT est connue pour être antiapoptotique (Huebscher *et al.*, 1999; Ouazia *et al.*, 2015). Par exemple, une étude a montré que le taux de Bcl-xl désamidée était réduit dans les tumeurs du foie

comparativement au foie sain (Takehara et Takahashi, 2003). Une étude a montré que la PIMT réparait Bcl-xl désamidée en la méthylant (Cimmino *et al.*, 2008).

De plus, p53 connue pour être un supresseur de tumeurs régule plusieurs processus cellulaire dont l'apoptose. Elle est régulée également par les lysines et arginines méthylases mais la régulation par la PIMT est une nouveauté (Lee *et al.*, 2012). D'autant plus que la p53 est mutée dans les glioblastomes multiformes (Ohgaki et Kleihues, 2005) mais aussi dans la lignée cellulaire de glioblastome humain U-87 MG (Cerrato *et al.*, 2001). Elle méthyle l'asparagine en position 29 et 30 et induit sa dégradation par le protéasome (Lee *et al.*, 2012).

L'ensemble de ces résultats démontre l'importance de la PIMT puisqu'elle pourrait protéger les cellules cancéreuses de la mort cellulaire lors de l'invasion. Cela suggère qu'elle pourrait être impliquée dans la formation des métastases. En effet, les cellules cancéreuses sont connues par leur capacité de rompre leur lien avec le tissu hôte pour aller envahir de nouveaux organes et faire des métastases.

Il faut noter la complexité de la matrice extracellulaire du cerveau d'autant plus qu'elle diffère des autres tissus. En effet, dans un cerveau sain au niveau du parenchyme on retrouve principalement de l'acide hyaluronique, des glycosaminoglycanes (GAGs), des protéoglycanes, la ténascine C et la thrombospondine. Les vaisseaux cérébraux sont plutôt riches en collagène (IV et V), la fibronectine, laminine, héparane sulfate, vitronectine et entactine (Bellail *et al.*, 2004). Mais, il a été démontré que l'infiltration des GBMs se fait à travers les vaisseaux cérébraux (Pedersen *et al.*, 1993). Conséquemment, nous sommes allés investiguer si la PIMT était impliquée dans l'invasion. Pour cela nous avons utilisé les chambres de Boyden recouvertes de Matrigel. Le Matrigel est composé d'un complexe protéique qui se rapproche le plus de la matrice extracellulaire.

Les résultats ont montré l'importance de l'expression de la PIMT dans la capacité invasive des cellules U-87 MG puisqu'une chute d'expression de la PIMT (ARNi) réduit significativement de 40 % l'invasion des cellules U-87 MG sur le Matrigel après 24 h



(Figure 3.5). Contrairement, les cellules U-87 MG transfectées avec le plasmide pCMV6-PIMT qui surexprimait la forme sauvage de la PIMT, induisaient doublement l'invasion et ceci de façon significative. Ces résultats ont également montré l'importance de l'activité catalytique de la PIMT puisque les cellules U-87 MG transfectées avec la forme mutée et inactive de la PIMT migraient de la même façon que les cellules contrôles transfectées avec le plasmide vide pCMV6 (Figure 3.10). Ces résultats suggèrent que cette enzyme est aussi impliquée dans l'invasion qui est un processus clé permettant aux cellules cancéreuses d'envahir d'autres organes et de former de nouveaux foyers, dites métastases.

Il a été rapporté dans la littérature que lorsque l'expression de la N-cadhérine était diminuée par ARNi, alors l'invasion sur le Matrigel des cellules cancéreuses gliales augmentait (Peglion et Etienne-Manneville, 2012). Il serait intéressant de s'y pencher de plus près. Considérant que la N-cadhérine est impliquée dans la polarité cellulaire, il serait intéressant de voir le rôle de la PIMT dans la régulation de l'expression de N-cadhérine pour mieux comprendre les mécanismes responsables de la migration dans les lignées cellulaires de glioblastomes et mieux comprendre le rôle de la PIMT dans l'invasion.

Des études dans notre laboratoire ont démontré que le niveau de PIMT était augmenté lorsque les cellules HUVEC étaient détachées de la matrice extracellulaire (Lanthier et Desrosiers, 2006). De plus, la PIMT était requise pour la formation de structures capillaires par les cellules endothéliales, plus précisément les HUVEC en présence de VEGF car une chute d'expression de la PIMT bloquait la formation de tubes malgré la stimulation du VEGF (Ouanouki et Desrosiers, 2016). Ainsi, ces résultats ont démontré l'importance de la PIMT dans l'angiogenèse processus qui permet l'apport de l'oxygène et des nutriments pendant la croissance tumorale. Tous ces résultats démontrent que la PIMT peut jouer un rôle oncogénique important car elle participe au processus migratoire des cellules cancéreuses et possiblement à l'angiogenèse tumorale. Cependant, les mécanismes moléculaires qui régulent cette enzyme dans ces différents processus restent à clarifier.

La PIMT est connue pour être régulée par différentes voies de signalisation. Précédemment dans notre laboratoire, nous avons démontré qu'il y avait un lien entre la PIMT et la voie ERK ainsi que la voie GSK-3/ $\beta$ -caténine (Cournoyer et Desrosiers, 2009). D'autre part, la  $\beta$ -caténine stimule la PIMT par la levée de l'inhibition de GSK-3 en amont de celle-ci (Cournoyer et Desrosiers, 2009). Une autre étude a également montré qu'il y avait une liaison entre la voie ERK et la PIMT et qu'elle serait responsable de la transition EMT. En effet, lorsque les cellules cancéreuses du sein MDA-MB-231 étaient détachées, il y avait une induction de l'intégrine  $\alpha_v$ , de la fibronectine, du TGF- $\beta$ 1 et de MMP-2, qui sont responsables de la stimulation de la migration et de l'invasion des cellules du cancer du sein MDA-MB-231 (Ryu *et al.*, 2011). Ces résultats peuvent ouvrir de nouvelles pistes d'investigations du rôle de cette enzyme. D'ailleurs, il a été rapporté que la voie de Wnt/ $\beta$ -caténine régule les activateurs de la transition EMT notamment dans les cellules cancéreuses du colon (Brabletz *et al.*, 1998). Il a été établi un lien entre la voie de Wnt/ $\beta$ -caténine très active avec la diminution de la survie des patients atteints de GBMs (Kahlert *et al.*, 2013). Cela est intéressant puisque dans notre laboratoire nous avons démontré que  $\beta$ -caténine activait la synthèse de la PIMT par la voie ERK/RSK-1/GSK-3/ $\beta$ -caténine comme expliqué précédemment (Cournoyer, 2009).

Donc, l'expression de la PIMT et plus particulièrement son activité catalytique joue un rôle important dans les capacités migratoire et invasive des cellules cancéreuses astrocytaires U-87 MG. Étant donné que les glioblastomes U-87 MG sont le principal modèle cellulaire des glioblastomes multifformes, on peut postuler qu'à moyen terme il sera essentiel d'identifier quels sont les substrats de la PIMT qui sont méthylés. D'autant plus qu'il a été rapporté que le collagène, la fibronectine, la tubuline et l'actine sont des substrats connus de la PIMT et ces protéines de la matrice extracellulaire sont responsables de la migration.

Dans notre laboratoire, nous avons démontré que la PIMT restaurait 72% la capacité des cellules cancéreuses rénales humaines à migrer sur du vieux collagène. Comme la

PIMT est majoritairement intracellulaire, l'excrétion de la PIMT vers la matrice extracellulaire permettrait de comprendre l'activation de la migration en réparant les protéines de la matrice extracellulaire qui présentent des résidus L-isoaspartates (Lanthier et Desrosiers, 2004). D'autant plus que les protéines de la matrice extracellulaire ont un temps de demi-vie long donc elles sont susceptibles d'accumuler des résidus L-isoaspartates.

En effet, leur identification aidera possiblement à comprendre comment leur méthylation par la PIMT agit sur les processus de migration. Des cibles potentielles incluent des protéines de signalisation comme les GTPases Rho ou encore des protéines régulatrices associées à la réorganisation du cytosquelette. D'ailleurs, des publications ont démontré que la PIMT pouvait être liée à une protéine, la microtubule associated protein 1-B (MAPB1), une protéine associée aux microtubules (Cueille *et al.*, 2007) mais également qu'elle pouvait réparer l'actine et la tubuline (Lanthier et Desrosiers, 2004). Toutes ces protéines jouent un rôle dans l'organisation du cytosquelette pour permettre la migration cellulaire. Ces données appuient sur le fait que la PIMT peut jouer un rôle crucial dans la migration en agissant sur les protéines du cytosquelette. L'ensemble de tous ces résultats démontre l'importance de continuer à investiguer sur les mécanismes moléculaires de la PIMT et de trouver de nouvelles cibles thérapeutiques pour bloquer le développement tumoral.

Des expériences complémentaires ont été faites pour aller voir si la PIMT agissait sur la sécrétion extracellulaire des métalloprotéinases (MMPs) pour favoriser la migration cellulaire. Les MMPs sont connues pour influencer l'environnement des cancers en favorisant l'angiogenèse, le développement de la tumeur et les métastases (Kalluri et Zeisberg, 2006). Les gélatinases MMP-2 et MMP-9 dégradent la matrice extracellulaire pour permettre l'invasion des cellules cancéreuses. Une zymographie a été faite des milieux conditionnés des cellules U-87 MG transfectées avec les ARNi dirigés contre la PIMT et non spécifique ou ceux de lignées stables transfectées avec les plasmides (pCMV6 vide, pCMV6-PIMT, pCMV6-PIMT (D83V)) (Figure 3.11). Les MMP-9 sont très peu ou pas observées dans les milieux conditionnés des cellules U-87 MG cela explique le fait que

seulement la forme pro-MMP-2 a été étudiée. La forme clivée MMP-2 n'a pas été observée dans aucune des conditions (Figure 3.11). Les cellules U-87 MG transfectées par un ARNi dirigé contre la PIMT ou un ARNi contrôle montrent seulement la forme pro-MMP-2 et les résultats ont la même allure pour les lignées stables, que cela soit pour les formes sauvage ou mutée et inactive de la PIMT comparativement à leur contrôles respectifs (Figure 3.11 B et D). Ces résultats ont démontré que la PIMT n'agissait pas au niveau de l'activation de cette gélatinase et a permis de rejeter ce mécanisme d'action. Cependant, dans les cellules cancéreuses du sein MDA-MB-231 la PIMT active MMP-2 (Ryu *et al.*, 2011). Étant donné que les cellules cancéreuses du sein sont des cellules épithéliales contrairement aux cellules de glioblastome humain cela peut expliquer la variance des résultats avec la PIMT.

En résumé, nos résultats montrent que l'implication de la PIMT est possible dans l'acquisition du phénotype tumoral chez les tumeurs astrocytaires. Mais il faut investiguer les mécanismes moléculaires régulateurs de cette enzyme et trouver les substrats spécifiques de la PIMT pour comprendre le mécanisme de méthylation dans les cellules cancéreuses des glioblastomes et trouver des cibles thérapeutiques permettant de développer éventuellement une nouvelle thérapie. Cette thérapie serait basée sur le développement d'un inhibiteur spécifique de la PIMT dans les cellules cancéreuses.

## CONCLUSION

La migration des cellules cancéreuses est une étape fondamentale pour le développement tumoral. Des recherches approfondies pour contrer les tumeurs cérébrales restent à développer. L'implication de la PIMT dans le cancer a très peu été explorée. Cependant, l'ensemble des résultats a révélé une nouvelle fonction de la PIMT comme régulateur clé oncogénique des glioblastomes U-87 MG. Il a été clairement démontré lors de cette étude qu'une chute de l'expression de cette enzyme diminuait la migration des glioblastomes U-87 MG. Inversement, la surexpression induisait la migration dans les différents essais. La même tendance était observée sur la capacité des cellules U-87 MG à envahir le Matrigel. D'autre part, la PIMT en méthylant des résidus L-isoaspartates présent dans les protéines de la matrice extracellulaire peut favoriser la migration des glioblastomes U-87 MG. De plus, la surabondance de la PIMT dans les glioblastomes U-87 MG détachées de la matrice extracellulaire (Lanthier et Desrosiers, 2006) et son effet antiapoptotique (Ouazia *et al.*, 2015) peut expliquer son rôle dans l'invasion. Enfin, elle est requise pour la formation de capillaires par les cellules endothéliales en présence de VEGF favorisant ainsi l'angiogenèse. Toutes ces propriétés phénotypiques emmènent clairement à postuler que la PIMT peut être impliquée dans le développement, l'angiogenèse et l'invasion tumorale. Les études doivent être plus approfondies car les résultats obtenus sont très encourageants. À l'avenir, il faut identifier les mécanismes moléculaires qui régule la PIMT dans le développement tumoral mais aussi investiguer sa participation dans la réorganisation du cytosquelette, processus important dans la migration cellulaire.

Donc, ces recherches plus approfondies sur les mécanismes moléculaires permettront possiblement de trouver des cibles thérapeutiques précises et de développer une thérapie basée, par exemple, sur un inhibiteur pharmacologique de la PIMT qui aidera à diminuer le développement des tumeurs astrocytaires.

## BIBLIOGRAPHIE

- Allan, J.A., Docherty, A.J., Barker, P.J., Huskisson, N.S., Reynolds, J.J. et Murphy, G. (1995). Binding of gelatinases A and B to type-I collagen and other matrix components. *Biochem J*, 309(1), 299-306.
- Aswad, D.W. (1984). Stoichiometric methylation of porcine adrenocorticotropin by protein carboxyl methyltransferase requires deamidation of asparagine 25. Evidence for methylation at the alpha-carboxyl group of atypical L-isoaspartyl residues. *J Biol Chem*, 259(17), 10714-10721.
- Aswad, D.W. et Deight, E.A. (1983). Purification and characterization of two distinct isozymes of protein carboxymethylase from bovine brain. *J Neurochem*, 40(6), 1718-1726.
- Aswad, D.W., Johnson, B.A. et Glass, D.B. (1987). Modification of synthetic peptides related to lactate dehydrogenase (231-242) by protein carboxyl methyltransferase and tyrosine protein kinase: effects of introducing an isopeptide bond between aspartic acid-235 and serine-236. *Biochemistry*, 26(3), 675-681.
- Axelrod, J. et Daly, J. (1965). Pituitary gland: enzymic formation of methanol from S-adenosylmethionine. *Science*, 150(3698), 892-893.
- Barten, D.M. et O'Dea, R.F. (1990). The function of protein carboxylmethyltransferase in eucaryotic cells. *Life Sciences*, 47(3), 181-194.
- Baudrimont, M. (1991). [Astrocytes: morphology and functional role]. *Ann Med Interne (Paris)*, 142(7), 526-529.
- Beasley, K.D. et Toms, S.A. (2011). The molecular pathobiology of metastasis to the brain: a review. *Neurosurg Clin N Am*, 22(1), 7-14.
- Bellail, A.C., Hunter, S.B., Brat, D.J., Tan, C. et Van Meir, E.G. (2004). Microregional extracellular matrix heterogeneity in brain modulates glioma cell invasion. *Int J Biochem Cell Biol*, 36(6), 1046-1069.
- Billingsley, M.L., Kim, S. et Kuhn, D.M. (1985). Immunohistochemical localization of protein-O-carboxylmethyltransferase in rat brain neurons. *Neuroscience*, 15(1), 159-171.

- Boivin, D., Bilodeau, D. et Béliveau, R. (1995). Immunochemical characterization of L-isoaspartyl-protein carboxyl methyltransferase from mammalian tissues. *Biochem J*, 309(3), 993-998.
- Brabletz, T., Jung, A., Hermann, K., Gunther, K., Hohenberger, W. et Kirchner, T. (1998). Nuclear overexpression of the oncoprotein beta-catenin in colorectal cancer is localized predominantly at the invasion front. *Pathol Res Pract*, 194(10), 701-704.
- Brat, D.J. et Mapstone, T.B. (2003). Malignant glioma physiology: cellular response to hypoxia and its role in tumor progression. *Ann Intern Med*, 138(8), 659-668.
- Brault, V., Moore, R., Kutsch, S., Ishibashi, M., Rowitch, D.H., McMahon, A.P., Sommer, L., Boussadia, O. et Kemler, R. (2001). Inactivation of the beta-catenin gene by Wnt1-Cre-mediated deletion results in dramatic brain malformation and failure of craniofacial development. *Development*, 128(8), 1253-1264.
- Camand, E., Peglion, F., Osmani, N., Sanson, M. et Etienne-Manneville, S. (2012). N-cadherin expression level modulates integrin-mediated polarity and strongly impacts on the speed and directionality of glial cell migration. *J Cell Sci*, 125(4), 844-857.
- Cathcart, J., Pulkoski-Gross, A. et Cao, J. (2015). Targeting matrix metalloproteinases in cancer: bringing new life to old Ideas. *Genes Dis*, 2(1), 26-34.
- Cerrato, J.A., Yung, W.K. et Liu, T.J. (2001). Introduction of mutant p53 into a wild-type p53-expressing glioma cell line confers sensitivity to Ad-p53-induced apoptosis. *Neuro Oncol*, 3(2), 113-122.
- Chen, W., Ji, J. et Ru, B. (2005). Proteomic analysis of corticobasal degeneration: a case study of corticobasal degeneration at the proteome level. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci*, 17(3), 364-371.
- Chondrogianni, N. et Gonos, E.S. (2010). Proteasome function determines cellular homeostasis and the rate of aging. *Adv Exp Med Biol*, 694, 38-46.
- Cimmino, A., Capasso, R., Muller, F., Sambri, I., Masella, L., Raimo, M., De Bonis, M.L., D'Angelo, S., Zappia, V., Galletti, P. et Ingrosso, D. (2008). Protein isoaspartate methyltransferase prevents apoptosis induced by oxidative stress in endothelial cells: role of Bcl-Xl deamidation and methylation. *PLoS One*, 3(9), 3258-3268.
- Clarke, S. (1985). Protein carboxyl methyltransferases: two distinct classes of enzymes. *Annu Rev Biochem*, 54, 479-506.

- Clarke, S. (1988). Perspectives on the biological function and enzymology of protein carboxyl methylation reactions in eucaryotic and procaryotic cells. *Adv Exp Med Biol*, 231, 213-228.
- Clarke, S. (1999). "A protein carboxyl methyltransferase that recognizes age-damaged peptides and proteins and participates in their repair". Dans Cheng, X., and Blumental, R.M (dir.), *S-Adenosylmethionine dependent methyltransferase: structure and function*" (p. 123-140). Singapore : World scientific publishing company.
- Clarke, S. (2003). Aging as war between chemical and biochemical processes: protein methylation and the recognition of age-damaged proteins for repair. *Ageing Res Rev*, 2(3), 263-285.
- Comité consultatif de la Société canadienne du cancer. (2015). *Statistiques canadiennes sur le cancer 2015*. Toronto (Ontario)
- Cournoyer, P. et Desrosiers, R.R. (2009). Valproic acid enhances protein L-isoaspartyl methyltransferase expression by stimulating extracellular signal-regulated kinase signaling pathway. *Neuropharmacology*, 56(5), 839-848.
- Cueille, N., Blanc, C.T., Riederer, I.M. et Riederer, B.M. (2007). Microtubule-associated protein 1B binds glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *J Proteome Res*, 6(7), 2640-2647.
- Curnis, F., Longhi, R., Crippa, L., Cattaneo, A., Dondossola, E., Bachi, A. et Corti, A. (2006). Spontaneous formation of L-isoaspartate and gain of function in fibronectin. *J Biol Chem*, 281(47), 36466-36476.
- David, C.L. et Aswad, D.W. (1995). Cloning, expression, and purification of rat brain protein L-isoaspartyl methyltransferase. *Protein Expr Purif*, 6(3), 312-318.
- David, C.L., Szumlanski, C.L., DeVry, C.G., Park-Hah, J.O., Clarke, S., Weinshilboum, R.M. et Aswad, D.W. (1997). Human erythrocyte protein L-isoaspartyl methyltransferase: heritability of basal activity and genetic polymorphism for thermal stability. *Arch Biochem Biophys*, 346(2), 277-286.
- Desrosiers, R.R. et Fanelus, I. (2011). Damaged proteins bearing L-isoaspartyl residues and aging: a dynamic equilibrium between generation of isomerized forms and repair by PIMT. *Curr Aging Sci*, 4(1), 8-18.



- DeVry, C.G., Tsai, W. et Clarke, S. (1996). Structure of the human gene encoding the protein repair L-isoaspartyl (D-aspartyl) O-methyltransferase. *Arch Biochem Biophys*, 335(2), 321-332.
- Diliberto, E.J., Jr. et Axelrod, J. (1974). Characterization and substrate specificity of a protein carboxymethylase in the pituitary gland. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 71(5), 1701-1704.
- Diliberto, E.J., Jr. et Axelrod, J. (1976). Regional and subcellular distribution of protein carboxymethylase in brain and other tissues. *J Neurochem*, 26(6), 1159-1165.
- English, J.A., Dicker, P., Focking, M., Dunn, M.J. et Cotter, D.R. (2009). 2-D DIGE analysis implicates cytoskeletal abnormalities in psychiatric disease. *Proteomics*, 9(12), 3368-3382.
- Etheridge, N., Lewohl, J.M., Mayfield, R.D., Harris, R.A. et Dodd, P.R. (2009). Synaptic proteome changes in the superior frontal gyrus and occipital cortex of the alcoholic brain. *Proteomics Clin Appl*, 3(6), 730-742.
- Fanelus, I. et Desrosiers, R.R. (2008). Reactive oxygen species generated by thiol-modifying phenylarsine oxide stimulate the expression of protein L-isoaspartyl methyltransferase. *Biochem Biophys Res Commun*, 371(2), 203-208.
- Ferrara, N. (2002). VEGF and the quest for tumour angiogenesis factors. *Nat Rev Cancer*, 2(10), 795-803.
- Fountoulakis, M., Juranville, J.F., Dierssen, M. et Lubec, G. (2002). Proteomic analysis of the fetal brain. *Proteomics*, 2(11), 1547-1576.
- Furuchi, T., Sakurako, K., Katane, M., Sekine, M. et Homma, H. (2010). The role of protein L-isoaspartyl/D-aspartyl O-methyltransferase (PIMT) in intracellular signal transduction. *Chem Biodivers*, 7(6), 1337-1348.
- Garcia-Segura, L.M., Diz-Chaves, Y., Perez-Martin, M. et Darnaudéry, M. (2007). Estradiol, insulin-like growth factor-I and brain aging. *Psychoneuroendocrinology*, 32, S57-S61.
- Gilbert, J.M., Fowler, A., Bleibaum, J. et Clarke, S. (1988). Purification of homologous protein carboxyl methyltransferase isozymes from human and bovine erythrocytes. *Biochemistry*, 27(14), 5227-5233.
- Gomord, V. et Faye, L. (2004). Posttranslational modification of therapeutic proteins in plants. *Curr Opin Plant Biol*, 7(2), 171-181.

- Graf, L., Bajusz, S., Patthy, A., Barat, E. et Cseh, G. (1971). Revised amide location for porcine and human adrenocorticotrophic hormone. *Acta Biochim Biophys Acad Sci Hung*, 6(4), 415-418.
- Griffith, S.C., Sawaya, M.R., Boutz, D.R., Thapar, N., Katz, J.E., Clarke, S. et Yeates, T.O. (2001). Crystal structure of a protein repair methyltransferase from *Pyrococcus furiosus* with its l-isoaspartyl peptide substrate1. *J Mol Biol*, 313(5), 1103-1116.
- Hanahan, D. et Weinberg, R.A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*, 100(1), 57-70.
- Hanahan, D. et Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), 646-674.
- Hatta, K. et Takeichi, M. (1986). Expression of N-cadherin adhesion molecules associated with early morphogenetic events in chick development. *Nature*, 320(6061), 447-449.
- Hazan, R.B., Qiao, R., Keren, R., Badano, I. et Suyama, K. (2004). Cadherin switch in tumor progression. *Ann N Y Acad Sci*, 1014, 155-163.
- Huebscher, K.J., Lee, J., Rovelli, G., Ludin, B., Matus, A., Stauffer, D. et Furst, P. (1999). Protein isoaspartyl methyltransferase protects from Bax-induced apoptosis. *Gene*, 240(2), 333-341.
- Ichikawa, J.K. et Clarke, S. (1998). A Highly Active Protein Repair Enzyme from an Extreme Thermophile: Thel-Isoaspartyl Methyltransferase from *Thermotoga maritima*. *Arch Biochem Biophys*, 358(2), 222-231.
- Ikegaya, Y., Yamada, M., Fukuda, T., Kuroyanagi, H., Shirasawa, T. et Nishiyama, N. (2001). Aberrant synaptic transmission in the hippocampal CA3 region and cognitive deterioration in protein-repair enzyme-deficient mice. *Hippocampus*, 11(3), 287-298.
- Ingrosso, D., D'Angelo, S., di Carlo, E., Perna, A.F., Zappia, V. et Galletti, P. (2000). Increased methyl esterification of altered aspartyl residues in erythrocyte membrane proteins in response to oxidative stress. *Eur J Biochem*, 267(14), 4397-4405.
- Ingrosso, D., Fowler, A.V., Bleibaum, J. et Clarke, S. (1989). Sequence of the D-aspartyl/L-isoaspartyl protein methyltransferase from human erythrocytes. Common sequence motifs for protein, DNA, RNA, and small molecule S-adenosylmethionine-dependent methyltransferases. *J Biol Chem*, 264(33), 20131-20139.

- Johnson, B.A., Freitag, N.E. et Aswad, D.W. (1985). Protein carboxyl methyltransferase selectively modifies an atypical form of calmodulin. Evidence for methylation at deamidated asparagine residues. *J Biol Chem*, 260(20), 10913-10916.
- Johnson, B.A., Langmack, E.L. et Aswad, D.W. (1987a). Partial repair of deamidation-damaged calmodulin by protein carboxyl methyltransferase. *J Biol Chem*, 262(25), 12283-12287.
- Johnson, B.A., Murray, E.D., Jr., Clarke, S., Glass, D.B. et Aswad, D.W. (1987b). Protein carboxyl methyltransferase facilitates conversion of atypical L-isoaspartyl peptides to normal L-aspartyl peptides. *J Biol Chem*, 262(12), 5622-5629.
- Kagan, R.M., McFadden, H.J., McFadden, P.N., O'Connor, C. et Clarke, S. (1997). Molecular phylogenetics of a protein repair methyltransferase. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 117(3), 379-385.
- Kahlert, U.D., Nikkhah, G. et Maciaczyk, J. (2013). Epithelial-to-mesenchymal(-like) transition as a relevant molecular event in malignant gliomas. *Cancer Lett*, 331(2), 131-138.
- Kalluri, R. et Zeisberg, M. (2006). Fibroblasts in cancer. *Nat Rev Cancer*, 6(5), 392-401.
- Khalil, A.A. (2007). Biomarker discovery: a proteomic approach for brain cancer profiling. *Cancer Sci*, 98(2), 201-213.
- Kim, S. et Paik, W.K. (1970). Purification and properties of protein methylase II. *J Biol Chem*, 245(7), 1806-1813.
- Kindrachuk, J., Parent, J., Davies, G.F., Dinsmore, M., Attah-Poku, S. et Napper, S. (2003). Overexpression of L-isoaspartate O-methyltransferase in Escherichia coli increases heat shock survival by a mechanism independent of methyltransferase activity. *J Biol Chem*, 278(51), 50880-50886.
- Kleihues, P., Soylemezoglu, F., Schauble, B., Scheithauer, B.W. et Burger, P.C. (1995). Histopathology, classification, and grading of gliomas. *Glia*, 15(3), 211-221.
- Lamarre, M. et Desrosiers, R.R. (2008). Up-regulation of protein L-isoaspartyl methyltransferase expression by lithium is mediated by glycogen synthase kinase-3 inactivation and beta-catenin stabilization. *Neuropharmacology*, 55(5), 669-676.
- Lanthier, J., Bouthillier, A., Lapointe, M., Demeule, M., Beliveau, R. et Desrosiers, R.R. (2002). Down-regulation of protein L-isoaspartyl methyltransferase in human

- epileptic hippocampus contributes to generation of damaged tubulin. *J Neurochem*, 83(3), 581-591.
- Lanthier, J. et Desrosiers, R.R. (2004). Protein L-isoaspartyl methyltransferase repairs abnormal aspartyl residues accumulated in vivo in type-I collagen and restores cell migration. *Exp Cell Res*, 293(1), 96-105.
- Lanthier, J. et Desrosiers, R.R. (2006). Regulation of protein L-isoaspartyl methyltransferase by cell-matrix interactions: involvement of integrin  $\alpha$ v $\beta$ 3, PI 3-kinase, and the proteasome. *Biochem Cell Biol*, 84(5), 684-694.
- Lee, J.C., Kang, S.U., Jeon, Y., Park, J.W., You, J.S., Ha, S.W., Bae, N., Lubec, G., Kwon, S.H., Lee, J.S., Cho, E.J. et Han, J.W. (2012). Protein L-isoaspartyl methyltransferase regulates p53 activity. *Nat Commun*, 3, 927-937.
- Li, W.W., Li, V.W., Hutnik, M. et Chiou, A.S. (2012). Tumor angiogenesis as a target for dietary cancer prevention. *J Oncol*, 2012, 879623.
- Lindner, H. et Helliger, W. (2001). Age-dependent deamidation of asparagine residues in proteins. *Exp Gerontol*, 36(9), 1551-1563.
- Liss, M., Maxam, A.M. et Cuprak, L.J. (1969). Methylation of protein by calf spleen methylase. *J Biol Chem*, 244(6), 1617-1622.
- Liu, S.C., Yang, S.F., Yeh, K.T., Yeh, C.M., Chiou, H.L., Lee, C.Y., Chou, M.C. et Hsieh, Y.S. (2006). Relationships between the level of matrix metalloproteinase-2 and tumor size of breast cancer. *Clin Chim Acta*, 371(1-2), 92-96.
- Louis, D.N., Ohgaki, H., Wiestler, O.D., Cavenee, W.K., Burger, P.C., Jouvett, A., Scheithauer, B.W. et Kleihues, P. (2007). The 2007 WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. *Acta Neuropathologica*, 114(2), 97-109.
- Lowenson, J.D. et Clarke, S. (1992). Recognition of D-aspartyl residues in polypeptides by the erythrocyte L-isoaspartyl/D-aspartyl protein methyltransferase. Implications for the repair hypothesis. *J Biol Chem*, 267(9), 5985-5995.
- Luo, J.W., Wang, X., Yang, Y. et Mao, Q. (2015). Role of micro-RNA (miRNA) in pathogenesis of glioblastoma. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 19(9), 1630-1639.
- MacLaren, D.C., Kagan, R.M. et Clarke, S. (1992a). Alternative splicing of the human isoaspartyl protein carboxyl methyltransferase RNA leads to the generation of a C-terminal-RDEL sequence in isozyme II. *Biochem Biophys Res Commun*, 185(1), 277-283.

- MacLaren, D.C., O'Connor, C.M., Xia, Y.R., Mehrabian, M., Klisak, I., Sparkes, R.S., Clarke, S. et Lusi, A.J. (1992b). The L-isoaspartyl/D-aspartyl protein methyltransferase gene (PCMT1) maps to human chromosome 6q22.3-6q24 and the syntenic region of mouse chromosome 10. *Genomics*, 14(4), 852-856.
- Mahvash, M., Hugo, H.H., Maslehaty, H., Mehdorn, H.M. et Stark, A.M. (2011). Glioblastoma multiforme in children: report of 13 cases and review of the literature. *Pediatr Neurol*, 45(3), 178-180.
- Mariotto, A.B., Yabroff, K.R., Shao, Y., Feuer, E.J. et Brown, M.L. (2011). Projections of the cost of cancer care in the United States: 2010-2020. *J Natl Cancer Inst*, 103(2), 117-128.
- Mikheeva, S.A., Mikheev, A.M., Petit, A., Beyer, R., Oxford, R.G., Khorasani, L., Maxwell, J.P., Glackin, C.A., Wakimoto, H., Gonzalez-Herrero, I., Sanchez-Garcia, I., Silber, J.R., Horner, P.J. et Rostomily, R.C. (2010). TWIST1 promotes invasion through mesenchymal change in human glioblastoma. *Mol Cancer*, 9, 194-211.
- Mizobuchi, M., Murao, K., Takeda, R. et Kakimoto, Y. (1994). Tissue-specific expression of isoaspartyl protein carboxyl methyltransferase gene in rat brain and testis. *J Neurochem*, 62(1), 322-328.
- Morin, A.M. et Liss, M. (1973). Evidence for a methylated protein intermediate in pituitary methanol formation. *Biochem Biophys Res Commun*, 52(2), 373-378.
- Murray, E. et Clarke, S. (1984). Synthetic peptide substrates for the erythrocyte protein carboxyl methyltransferase. Detection of a new site of methylation at isomerized L-aspartyl residues. *J Biol Chem*, 259(17), 10722-10732.
- Ohgaki, H. et Kleihues, P. (2005). Population-based studies on incidence, survival rates, and genetic alterations in astrocytic and oligodendroglial gliomas. *J Neuropathol Exp Neurol*, 64(6), 479-489.
- Ota, I.M., Gilbert, J.M. et Clarke, S. (1988). Two major isozymes of the protein D-aspartyl/L-isoaspartyl methyltransferase from human erythrocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, 151(3), 1136-1143.
- Ouanouki, A. et Desrosiers, R.R. (2016). The enzyme L-isoaspartyl (D-aspartyl) methyltransferase is required for VEGF-dependent endothelial cell migration and tubulogenesis. *Mol Cell Biochem*, 413(1-2), 37-46.

- Ouazia, D., Levros, L.C., Jr., Rassart, E. et Desrosiers, R.R. (2014). Dopamine down-regulation of protein L-isoaspartyl methyltransferase is dependent on reactive oxygen species in SH-SY5Y cells. *Neuroscience*, 267, 263-276.
- Ouazia, D., Levros, L.C., Jr., Rassart, E. et Desrosiers, R.R. (2015). The protein L-isoaspartyl (d-aspartyl) methyltransferase protects against dopamine-induced apoptosis in neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Neuroscience*, 295, 139-150.
- Paranandi, M.V., Guzzetta, A.W., Hancock, W.S. et Aswad, D.W. (1994). Deamidation and isoaspartate formation during in vitro aging of recombinant tissue plasminogen activator. *J Biol Chem*, 269(1), 243-253.
- Pedersen, P.H., Marienhagen, K., Mork, S. et Bjerkvig, R. (1993). Migratory pattern of fetal rat brain cells and human glioma cells in the adult rat brain. *Cancer Res*, 53(21), 5158-5165.
- Peglion, F. et Etienne-Manneville, S. (2012). N-cadherin expression level as a critical indicator of invasion in non-epithelial tumors. *Cell Adh Migr*, 6(4), 327-332.
- Pelham, H.R. (1990). The retention signal for soluble proteins of the endoplasmic reticulum. *Trends Biochem Sci*, 15(12), 483-486.
- Pepperkok, R., Hotz-Wagenblatt, A., Konig, N., Girod, A., Bossemeyer, D. et Kinzel, V. (2000). Intracellular distribution of mammalian protein kinase A catalytic subunit altered by conserved Asn2 deamidation. *J Cell Biol*, 148(4), 715-726.
- Pozzi Mucelli, S., Odreman, F., Gonzales, M.L., Gerardi, E., Stanta, G. et Vindigni, A. (2006). Proteomic studies on the white matter of human brain. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 833(1), 80-90.
- Radisky, E.S. et Radisky, D.C. (2010). Matrix metalloproteinase-induced epithelial-mesenchymal transition in breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 15(2), 201-212.
- Reissner, K.J. et Aswad, D.W. (2003). Deamidation and isoaspartate formation in proteins: unwanted alterations or surreptitious signals? *Cell Mol Life Sci*, 60(7), 1281-1295.
- Ruegg, C. et Mariotti, A. (2003). Vascular integrins: pleiotropic adhesion and signaling molecules in vascular homeostasis and angiogenesis. *Cell Mol Life Sci*, 60(6), 1135-1157.

- Ryttersgaard, C., Griffith, S.C., Sawaya, M.R., MacLaren, D.C., Clarke, S. et Yeates, T.O. (2002). Crystal structure of human L-isoaspartyl methyltransferase. *J Biol Chem*, 277(12), 10642-10646.
- Ryu, J., Song, J., Heo, J., Jung, Y., Lee, S.-J., Hong, S. et Cho, J.Y. (2011). Cross-regulation between protein L-isoaspartyl O-methyltransferase and ERK in epithelial mesenchymal transition of MDA-MB-231 cells. *Acta Pharmacol Sin*, 32(9), 1165-1172.
- Sandu, A.L., Izard, E., Specht, K., Beneventi, H., Lundervold, A. et Ystad, M. (2014). Post-adolescent developmental changes in cortical complexity. *Behav Brain Funct*, 10, 44-52.
- Shimizu, T., Matsuoka, Y. et Shirasawa, T. (2005). Biological significance of isoaspartate and its repair system. *Biol Pharm Bull*, 28(9), 1590-1596.
- Shimizu, T., Watanabe, A., Ogawara, M., Mori, H. et Shirasawa, T. (2000). Isoaspartate formation and neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Arch Biochem Biophys*, 381(2), 225-234.
- Shirasawa, T., Endoh, R., Zeng, Y.X., Sakamoto, K. et Mori, H. (1995). Protein L-isoaspartyl methyltransferase: developmentally regulated gene expression and protein localization in the central nervous system of aged rat. *Neurosci Lett*, 188(1), 37-40.
- Skinner, M.M., Puvathingal, J.M., Walter, R.L. et Friedman, A.M. (2000). Crystal Structure of Protein Isoaspartyl Methyltransferase: A Catalyst for Protein Repair. *Structure*, 8(11), 1189-1201.
- Smith, C.D., Carson, M., Friedman, A.M., Skinner, M.M., Delucas, L., Chantalat, L., Weise, L., Shirasawa, T. et Chattopadhyay, D. (2002). Crystal structure of human L-isoaspartyl-O-methyl-transferase with S-adenosyl homocysteine at 1.6-A resolution and modeling of an isoaspartyl-containing peptide at the active site. *Protein Sci*, 11(3), 625-635.
- Spittaels, K., Van den Haute, C., Van Dorpe, J., Terwel, D., Vandezande, K., Lasrado, R., Bruynseels, K., Irizarry, M., Verhoye, M., Van Lint, J., Vandenheede, J.R., Ashton, D., Mercken, M., Loos, R., Hyman, B., Van der Linden, A., Geerts, H. et Van Leuven, F. (2002). Neonatal neuronal overexpression of glycogen synthase kinase-3 beta reduces brain size in transgenic mice. *Neuroscience*, 113(4), 797-808.



- Staatz, W.D., Fok, K.F., Zutter, M.M., Adams, S.P., Rodriguez, B.A. et Santoro, S.A. (1991). Identification of a tetrapeptide recognition sequence for the alpha 2 beta 1 integrin in collagen. *J Biol Chem*, 266(12), 7363-7367.
- Takehara, T. et Takahashi, H. (2003). Suppression of Bcl-xL deamidation in human hepatocellular carcinomas. *Cancer Res*, 63(12), 3054-3057.
- Tso, C.L., Shintaku, P., Chen, J., Liu, Q., Liu, J., Chen, Z., Yoshimoto, K., Mischel, P.S., Cloughesy, T.F., Liao, L.M. et Nelson, S.F. (2006). Primary glioblastomas express mesenchymal stem-like properties. *Mol Cancer Res*, 4(9), 607-619.
- Urbanska, K., Sokolowska, J., Szmidt, M. et Sysa, P. (2014). Glioblastoma multiforme - an overview. *Contemp Oncol (Pozn)*, 18(5), 307-312.
- Verdecchia, A., De Angelis, G. et Capocaccia, R. (2002). Estimation and projections of cancer prevalence from cancer registry data. *Stat Med*, 21(22), 3511-3526.
- Weber, D.J. et McFadden, P.N. (1997). Detection and characterization of a protein isoaspartyl methyltransferase which becomes trapped in the extracellular space during blood vessel injury. *J Protein Chem*, 16(4), 257-267.
- Winters, J.L., Wilson, D. et Davis, D.G. (2001). Congenital glioblastoma multiforme: a report of three cases and a review of the literature. *J Neurol Sci*, 188(1-2), 13-19.
- Witzmann, F.A., Arnold, R.J., Bai, F., Hrnčirova, P., Kimpel, M.W., Mechref, Y.S., McBride, W.J., Novotny, M.V., Pedrick, N.M., Ringham, H.N. et Simon, J.R. (2005). A proteomic survey of rat cerebral cortical synaptosomes. *Proteomics*, 5(8), 2177-2201.
- Xie, H. et Clarke, S. (1994). Protein phosphatase 2A is reversibly modified by methyl esterification at its C-terminal leucine residue in bovine brain. *J Biol Chem*, 269(3), 1981-1984.
- Yamamoto, A., Takagi, H., Kitamura, D., Tatsuoka, H., Nakano, H., Kawano, H., Kuroyanagi, H., Yahagi, Y., Kobayashi, S., Koizumi, K., Sakai, T., Saito, K., Chiba, T., Kawamura, K., Suzuki, K., Watanabe, T., Mori, H. et Shirasawa, T. (1998). Deficiency in protein L-isoaspartyl methyltransferase results in a fatal progressive epilepsy. *J Neurosci*, 18(6), 2063-2074.
- Young, G.W., Hoofring, S.A., Mamula, M.J., Doyle, H.A., Bunick, G.J., Hu, Y. et Aswad, D.W. (2005). Protein L-isoaspartyl methyltransferase catalyzes in vivo racemization of Aspartate-25 in mammalian histone H2B. *J Biol Chem*, 280(28), 26094-26098.